

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 8 月 7 日(07.08.2014)

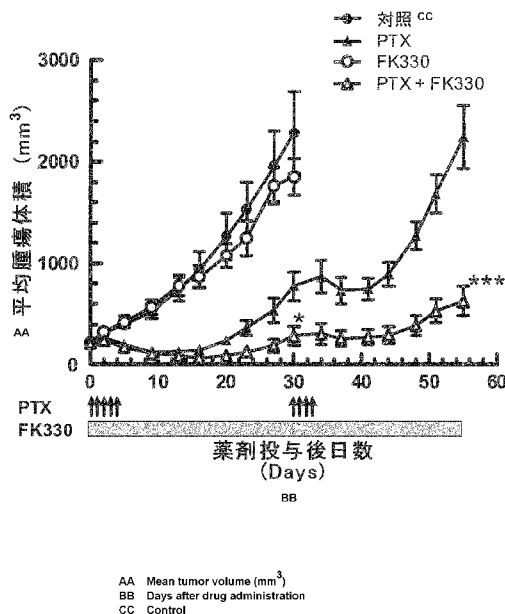


(10) 国際公開番号
WO 2014/118946 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/506 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/052231
- (22) 国際出願日: 2013 年 1 月 31 日(31.01.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: アステラス製薬株式会社(ASTELLAS PHARMA INC.) [JP/JP]; 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 荒井 幸規(ARAI, Yukinori); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 3 番 1 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP). 網野 伸明(AMINO, Nobuaki); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 3 番 1 1 号 アステラス製薬株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 森田 拓, 外(MORITA, Hiroshi et al.); 〒1038411 東京都中央区日本橋本町二丁目 3 番 1 1 号 アステラス製薬株式会社 知的財産部内 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR TREATING CANCER BY COMBINED USE OF DRUGS

(54) 発明の名称: 薬剤の併用による癌治療方法



(57) Abstract: [Problem] To meet a demand for a therapeutic method whereby the medicinal effects of taxane-based antitumor agents on various tumors can be enhanced. [Solution] The present inventor conducted studies on a method for enhancing the antitumor effects of taxane-based antitumor agents and, as a result, confirmed that a composition for treating cancer, said composition comprising as an active ingredient N²-[(2E)-3-(4-chlorophenyl)-2-propenoyl]-N-[2-oxo-2-(4-{[6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-yl]oxy}piperidin-1-yl)ethyl]-3-pyridin-2-yl-L-alanineamide (FK330) or a salt thereof, enhances the antitumor effects of taxane-based antitumor agents to thereby complete the present invention. Thus, the present invention relates to a composition for treating cancer, said composition comprising FK330 or a salt thereof as an active ingredient and being to be administered in combination with one or more antitumor agents selected from among taxane-based antitumor agents. In one embodiment, the present invention relates to a composition for treating prostatic cancer or ovarian cancer.

(57) 要約: 【課題】タキサン系抗腫瘍剤の、各種腫瘍に対する薬効を増大させる治療方法が求められている。【解決手段】本発明者は、タキサン系抗腫瘍剤の抗腫瘍作用増強方法について検討した結果、N²-[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド (FK330) 又はその塩を有効成分として含有する癌治療用組成物が、タキサン系抗腫瘍剤の抗腫瘍作用を増強させることを確認し、本発明を完成した。即ち、本願は、タキサン系抗腫瘍剤から選択される 1 以上の抗腫瘍剤との併用投与

用である、FK330 又はその塩を有効成分として含有する癌治療用組成物、ある態様としては、前立腺癌又は卵巣癌治療用組成物に関する。

明 細 書

発明の名称： 薬剤の併用による癌治療方法

技術分野

[0001] 本発明は医薬、殊に N^2 -[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド又はその塩を有効成分として含む、タキサン系抗腫瘍剤と併用するための癌治療用組成物に関する。

背景技術

[0002] 悪性腫瘍の化学療法において、タキサン系抗腫瘍剤、殊にパクリタキセルやドセタキセルはいくつかの癌腫において有効な薬剤として使用されている。

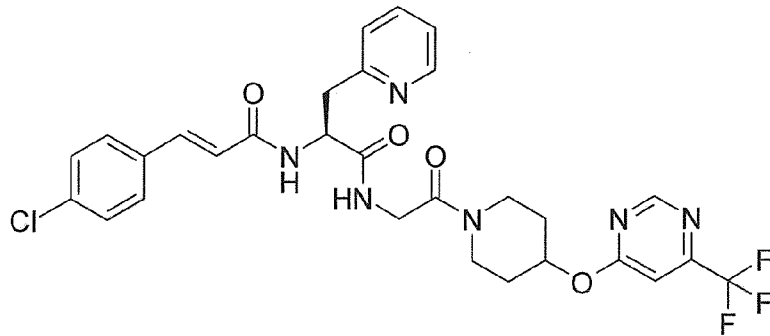
タキサン系抗腫瘍剤は、細胞分裂に必要な微小管の脱重合を阻害することで、癌細胞の分裂を阻害することが知られている。パクリタキセルは卵巣癌、非小細胞肺癌、乳癌、胃癌等の治療に、ドセタキセルは乳癌、非小細胞肺癌、胃癌、頭頸部癌、卵巣癌、食道癌、子宮体癌等の治療に使用されている。

臨床場においては、薬効の増強や抗癌スペクトラムの拡大を目的に、タキサン系抗腫瘍剤と作用機序の異なる他の抗腫瘍剤を組み合わせた多剤併用療法が行われている。例えば、パクリタキセルとカルボプラチンの併用 (Cancer, 1996, 77:2458-63.) や、ドセタキセルとシスプラチン等の併用が知られている (Eur. J. Surg. Oncol. 2006 32 (3) 297-302)。また、アメリカ食品医薬品局 (FDA) が提供する各種データベース、例えば、"Drugs@FDA" (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>) や欧州医薬品庁 (EMA) のホームページ (<http://www.ema.europa.eu/>) には、パクリタキセルやドセタキセルと他の抗腫瘍剤を併用する臨床レジメンが開示されている。

[0003] 一般に、抗腫瘍剤の投与量を多くすると、副作用もそれに比例して見られることから、その投与は慎重になされる必要がある。そのため、抗腫瘍剤の投与においては副作用の観点から最大耐用量（MTD）が設定され、その投与量が制限されている。また、例えば、日本の医薬品医薬機器情報提供ホームページのタキソール注（登録商標：パクリタキセルの商品名）の添付文書によると、パクリタキセルは「1日1回210mg/m²を3時間かけて点滴静注し、少なくとも3週間休薬する。これを1クールとして投与を繰り返す。なお、投与量は、年齢、症状により適宜減量する」と記載される様に、パクリタキセルは用量に加え投与方法も特定されている。また、タキソテール注（登録商標：ドセタキセルの商品名）についても「1回最高用量は70mg/m²とする」との記載があり用量が指示されている。

[0004] 一方、良好な一酸化窒素(NO)合成酵素（NOS）阻害活性を有するペプチド誘導体が国際公開02/055541号パンフレット（特許文献1）に開示されている。殊に、当該公報に実施例41として開示され、下式で示される、N²-[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド（FR260330、又はFK330と称する）は、優れた誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible NOS, iNOS)阻害活性を示すことが報告されており（非特許文献1）、さらにFK330がラット大動脈移植の慢性拒絶モデルで有効であることが報告されている（非特許文献2）。また、サル腎虚血/再灌流障害及びラット肝移植における虚血/再灌流障害においても有効であること（非特許文献3、4）や、TGFβ1の増加若しくは星細胞の活性化によって誘導される繊維化を抑制し、肝硬変治療に有効であること（特許文献2、非特許文献5）、さらに、炎症性角化症、角化症、又は炎症性皮膚疾患にも有効であること（特許文献3）が既に報告されている。

[化1]



[0005] iNOSは、上皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ等の種々のタイプの細胞で発現が認められ、感染や炎症などにより誘導されたサイトカイン等により転写レベルでその発現が誘導され、NOを産生する。iNOSは、感染や生体防御等での中心的なメディエーターの役割を担っている。

[0006] NOは癌の進行或いは転移を促進する一方、これらを抑制することがあることも、これまでの数多くの研究から、明らかになっている。NOの癌における作用は、NOSアイソフォームの活性や局在性、NO暴露の濃度や期間、NOに対する細胞の感受性に依存する(非特許文献6)ことが報告されており、NO産生促進及びNO産生抑制の両面から癌の生理学的研究がなされており、癌治療への応用には、NO産生促進またはNO産生阻害の何れがよいのか一定の見解は得られていない(非特許文献7及び8)。

非特許文献9及び10には、ヒト卵巣癌細胞や頸頭癌細胞において、低濃度のNOはシスプラチン及びパクリタキセルによるアポトーシスを抑制する傾向を示し、高濃度のNOはアポトーシスを促進することが記載されている。これらの文献には、iNOS阻害剤1400WとサーバイビンRNAiの併用によってパクリタキセルだけでなくシスプラチンによるアポトーシスを促進することも記載されており、NOの細胞保護効果はパクリタキセル選択的な作用ではないといえる。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第02/055541号パンフレット

特許文献2：特許第3700854号公報

特許文献3：特開2006-008621号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：European Journal of Pharmacology 509, 71, (2005)

非特許文献2：Transplantation 79, 10 1386 (2005)

非特許文献3：Transplantation 81, 4, 627 (2006)

非特許文献4：American Journal of Transplantation 6, 9, 2013 (2006)

非特許文献5：Wound Repair and Regeneration 15, 881 (2007)

非特許文献6：Nature Reviews Cancer, 6(7), 521-34 (2006)

非特許文献7：Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 67, 1211-1224 (2011)

非特許文献8：Nitric Oxide 19, 158-163 (2008)

非特許文献9：Cancer Research, 68, 5158-5166 (2008)

非特許文献10：International Journal of Cancer, 124, 2033-2041 (2009)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] タキサン系抗腫瘍剤は各種腫瘍の治療に有用であるが、副作用の点から投与量や用法が制限されており、投与量を増加させることなく、各種腫瘍に対する薬効をより増大させる治療方法が今なお求められている。また、治療当初は有効であるものの、治療を継続するうちに抗腫瘍効果が減弱する獲得耐性が問題となっている。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者は、タキサン系抗腫瘍剤の抗腫瘍作用増強方法について鋭意検討した結果、意外にもN²-[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミドを併用することにより、顕著な抗腫瘍作用増強が達成されること、及び、その増強作用のメカ

ニズムを知見して本発明を完成した。

即ち、本発明は、

(1) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせ併用投与するように用いられることを特徴とする、FK330又はその塩を有効成分として含有する癌治療用組成物に関する。

[0011] さらにある態様を以下に示す。

(2) パクリタキセル又はドセタキセルと組み合わせ併用投与するように用いられることを特徴とする(1)記載の組成物。

(3) パクリタキセルと組み合わせ併用投与するように用いられることを特徴とする(2)記載の組成物。

(4) ドセタキセルと組み合わせ併用投与するように用いられることを特徴とする(2)記載の組成物。

(5) 60~1200mg/日のFK330又はその塩を含有する経口投与用組成物である(1)乃至(4)記載の組成物。

(6) 60~200mg/日のFK330又はその塩を含有する経口投与用組成物である(5)記載の組成物。

(7) 更に、プラチナ系抗腫瘍剤、アントラサイクリン系抗腫瘍剤、シクロフォスファミド、フルオロウラシル、トラスツズマブ及びカペシタビンから選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせ併用投与するよう利用されることを特徴とする(1)乃至(6)記載の組成物。

(8) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の1投与サイクル中の少なくとも1日において併用投与するように用いられることを特徴とする、(1)乃至(6)記載の組成物。

(9) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の投与日の少なくとも1日において併用投与するように用いられることを特徴とする、(8)記載の組成物。

(10) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の1投与サイクル中の全日において併用投与するように用いられることを特徴とする、

(8) 記載の組成物。

[0012] また、本願発明は以下の発明にも関する。

(11) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と同時に、別々に、連続して、或いは、間隔をあけて投与されることを特徴とする、(1)乃至(6)記載の癌治療用組成物。

(12) FK330又はその塩を有効成分として含有する、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤による治療を受けている対象を治療するための癌治療用組成物。

(13) タキサン系抗腫瘍剤が用いられている癌の治療用である(1)乃至(12)記載の癌治療用組成物。

(14) タキサン系抗腫瘍剤が用いられている癌が非小細胞肺癌、前立腺癌、乳癌、又は胃癌である(13)記載の癌治療用組成物。

(15) タキサン系抗腫瘍剤が用いられている癌が非小細胞肺癌である(13)記載の癌治療用組成物。

(16) タキサン系抗腫瘍剤が用いられている癌が前立腺癌又は去勢抵抗性前立腺癌である(13)記載の癌治療用組成物。

[0013] さらに、本発明は以下の発明にも関する。

(17) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の併用治療に用いる場合の治療有効用量、並びに、FK330又はその塩の併用治療に用いる場合の治療有効用量を組み合わせ、対象に投与することを特徴とする癌の治療方法。

(18) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の併用治療に用いる場合の治療有効用量、並びに、FK330又はその塩の併用治療に用いる場合の治療有効用量を、同時に、別々に、連続して、或いは間隔をあけて、対象に投与することを特徴とする癌の治療方法。

なお、「対象」とは、その予防若しくは治療を必要とするヒト又はその他の動物であり、ある態様としては、その予防若しくは治療を必要とするヒトである。

[0014] またさらに、本願発明は以下の発明にも関する。

(19) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与されるように用いられることを特徴とする癌治療用組成物を製造するための、FK330又はその塩の使用。

(20) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与されるように用いられることを特徴とする、癌治療のための、FK330又はその塩。

(21) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて投与することを特徴とする、FK330又はその塩を有効成分として含有する癌治療剤。

(22) FK330又はその塩を有効成分として含有する、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の抗腫瘍作用増強剤。

(23) FK330又はその塩を有効成分として含有する、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の耐性化抑制剤又は耐性化予防剤。

(24) FK330又はその塩を有効成分として含有する、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の感受性増強剤。

[0015] 加えて、本願発明は以下の発明にも関する。

(25) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与するように用いられることを特徴とする、FK330又はその塩を有効成分として含有する前立腺癌又は卵巣癌治療用組成物。

(26) パクリタキセル又はドセタキセルと組み合わせて併用投与するように用いられることを特徴とする(25)記載の組成物。

(27) パクリタキセルと組み合わせて併用投与するように用いられることを特徴とする(26)記載の組成物。

(28) ドセタキセルと組み合わせて併用投与するように用いられることを特徴とする(26)記載の組成物。

(29) 60~1200mg/日のFK330又はその塩を含有する経口投与用組成物である(25)乃至(28)記載の組成物。

(30) 60~200mg/日のFK330又はその塩を含有する経口投与用組成物である(29)記載の組成物。

(31) 更に、プラチナ系抗腫瘍剤、アントラサイクリン系抗腫瘍剤、シクロフォスファミド、フルオロウラシル、トラスツズマブ及びカペシタビンから選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与するよう用いられることを特徴とする(25)乃至(30)記載の組成物。

(32) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と同時に、別々に、連続して、或いは、間隔をあけて投与されることを特徴とする、(25)乃至(30)記載の組成物。

(33) FK330又はその塩を有効成分として含有する、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤による治療を受けている対象を治療するための前立腺癌又は卵巣癌治療用組成物。

(34) タキサン系抗腫瘍剤が用いられている前立腺癌の治療用である(25)乃至(33)記載の癌治療用組成物。

(35) 前立腺癌が去勢抵抗性前立腺癌である(34)記載の癌治療用組成物。

(36) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与するよういられることを特徴とする前立腺癌又は卵巣癌治療用組成物を製造するための、FK330又はその塩の使用。

(37) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与されるよういられることを特徴とする、前立腺癌又は卵巣癌治療のための、FK330又はその塩。

(38) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の併用治療に用いる場合の治療有効用量、並びに、FK330又はその塩の併用治療に用いる場合の治療有効用量を組み合わせ、対象に投与することを特徴とする前立腺癌又は卵巣癌の治療方法。

(39) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の併用治療に用いる場合の治療有効用量、並びに、FK330又はその塩の併用治療に用いる

場合の治療有効用量を、同時に、別々に、連続して、或いは間隔をあけて、対象に投与することを特徴とする前立腺癌又は卵巣癌の治療方法。

発明の効果

[0016] 本発明のFK330又はその塩を有効成分として含有する癌治療用組成物とタキサン系抗腫瘍剤との併用により、タキサン系抗腫瘍剤の癌治療効果の増強が達成されることから、本願発明の癌治療用組成物は、既存のタキサン系抗腫瘍剤が適応されることが知られる各種癌の治療に、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と併用して使用できる。適応される癌としては、タキサン系抗腫瘍剤が用いられている固形癌及びリンパ腫である。適応される癌の別の態様としては、タキサン系抗腫瘍剤が用いられている前立腺癌又は卵巣癌である。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図1は、実施例1において、FK330とドキソルビシンの単独又は併用投与における抗腫瘍効果を示すグラフである。Doxはドキソルビシンを示す。

[図2]図2は、実施例1において、FK330とゲムシタビンの単独又は併用投与における抗腫瘍効果を示すグラフである。Gemはゲムシタビンを示す。

[図3]図3は、実施例1において、FK330とイリノテカンの単独又は併用投与における抗腫瘍効果を示すグラフである。Iriはイリノテカンを示す。

[図4]図4は、実施例1において、FK330とカルボプラチンの単独又は併用投与における抗腫瘍効果を示すグラフである。CBDCAはカルボプラチンを示す。

[図5]図5は、実施例1において、FK330とパクリタキセルの単独又は併用投与における抗腫瘍効果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図6]図6は、実施例1において、FK330とドセタキセルの単独又は併用投与における抗腫瘍効果を示すグラフである。Doceはドセタキセルを示す。

[図7]図7は、ヒト非小細胞肺癌（Calu-6）担癌マウスにおけるFK330のパクリタキセル複数サイクル投与時の抗腫瘍効果増強作用を検討した実施例2の結果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図8]図8は、ヒト非小細胞肺癌（Calu-6）担癌マウスにおけるFK330のパク

リタキセルの抗腫瘍効果増強作用の用量依存性を検討した実施例3の結果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図9]図9は、ヒト非小細胞肺癌（Calu-6）担癌マウスにおけるFK330の投与タイミングを検討した実施例4の結果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図10]図10は、ヒト胃癌（AZ-521）担癌マウスにおけるFK330によるパクリタキセルの抗腫瘍効果増強作用を検討した実施例5の結果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図11]図11は、ヒト胃癌（MKN-28）担癌マウスにおけるFK330によるパクリタキセルの抗腫瘍効果増強作用を検討した実施例5の結果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図12]図12は、ヒト胃癌（NCI-N87）担癌マウスにおけるFK330によるパクリタキセルの抗腫瘍効果増強作用を検討した実施例5の結果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図13]図13は、ヒト乳癌細胞（MDA-MB-231）担癌マウスにおけるFK330によるパクリタキセルの抗腫瘍効果増強作用を検討した実施例6の結果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図14]図14は、タキサン誘発チューブリン重合作用に対するNO供与体であるSNAPの抑制作用を検討した実施例7の結果を示すグラフである。A)及びB)は、パクリタキセル誘発チューブリン重合に対するSNAPの抑制作用の代表例とチューブリン重合開始後60分の集計値をそれぞれ示す。PTXはパクリタキセル、SNAPはS-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamineを示す。

[図15]図15は、タキサン誘発チューブリン重合作用に対するNO供与体であるSNAPの抑制作用を検討した実施例7の結果を示すグラフである。A)及びB)は、ドセタキセル誘発チューブリン重合に対するSNAPの抑制作用の代表例とチューブリン重合開始後60分の集計値をそれぞれ示す。DTXはドセタキセル、SNAPはS-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamineを示す。

[図16]図16は、ヒト肺癌細胞株Calu-6担癌マウスにおいて、パクリタキセ

ル単独及びFK330併用時の腫瘍組織内iNOS蛋白発現に対する作用を検討した実施例8の結果を示したグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図17]図17は、ヒト肺癌細胞株Calu-6担癌マウスにおいて、パクリタキセル単独及びFK330併用時の腫瘍組織内マクロファージ（F4/80）浸潤に対する作用を検討した実施例8の結果を示したグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図18]図18は、ヒト肺癌細胞株Calu-6担癌マウスにおいて、パクリタキセル単独及びFK330併用時の腫瘍組織内ニトロチロシン（NOの主な最終生成物）発現に対する作用を検討した実施例8の結果を示したグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図19]図19は、ヒトホルモン抵抗性前立腺癌細胞（PC-3）担癌マウスにおけるFK330によるパクリタキセルの抗腫瘍効果増強作用を検討した実施例9の結果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

[図20]図20は、ヒトホルモン抵抗性前立腺癌細胞（PC-3）担癌マウスにおけるFK330によるドセタキセルの抗腫瘍効果増強作用を検討した実施例10の結果を示すグラフである。DTXはドセタキセルを示す。

[図21]図21は、ヒト乳癌細胞（MDA-MB-468）担癌マウスにおけるFK330によるドセタキセルの抗腫瘍効果増強作用を検討した実施例11の結果を示すグラフである。DTXはドセタキセルを示す。

[図22]図22は、ヒト卵巣癌細胞（MCAS）担癌マウスにおけるFK330によるパクリタキセルの抗腫瘍効果増強作用を検討した実施例12の結果を示すグラフである。PTXはパクリタキセルを示す。

発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0019] 本発明の「癌治療用組成物」は、タキサン系抗腫瘍剤と併用するための医薬組成物であり、別の態様としては、タキサン系抗腫瘍剤の抗腫瘍作用を増強する医薬組成物である。

[0020] 本発明の「癌治療用組成物」における「癌」には、タキサン系抗腫瘍剤が

用いられている癌、即ち、タキサン系抗腫瘍剤が用いられているすべての固形癌及びリンパ腫が含まれる。ある態様としては、乳癌、子宮体癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、胃（胃腺）癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、膀胱癌、メラノーマ、大腸癌、腎細胞癌、非ホジキンリンパ腫、尿路上皮癌等が挙げられる。別の態様としては、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、胃（胃腺）癌、非小細胞肺癌等、また別の態様としては、卵巣癌、前立腺癌等、さらに別の態様としては、乳癌、またさらに別の態様としては、非小細胞肺癌、別の態様としては、前立腺癌が挙げられる。

乳癌の別の態様としては、例えば、HER2陽性転移性乳癌、HER2陰性転移性乳癌、HER2陽性乳癌、或いは、転移性乳癌が挙げられ、別の態様としては、HER2陰性転移性乳癌が挙げられ、また別の態様としては、HER2陽性転移性乳癌が挙げられる。

非小細胞肺癌の別の態様としては、例えば、局所進行性非小細胞肺癌、或いは、転移性の非小細胞肺癌が挙げられ、別の態様としては、非小細胞肺癌における非扁平上皮癌が挙げられ、また別の態様としては、転移性の非小細胞肺癌における非扁平上皮癌が挙げられ、さらに別の態様としては、転移性の非小細胞肺癌における扁平上皮癌が挙げられる。

胃癌の別の態様としては、転移性胃癌、転移性胃食道接合部癌等が挙げられる。

前立腺癌の別の態様としては、ホルモン抵抗性前立腺癌が挙げられる。ホルモン抵抗性前立腺癌のある態様としては、去勢抵抗性前立腺癌が挙げられる。去勢抵抗性前立腺癌のある態様としては、転移性去勢抵抗性前立腺癌が挙げられる。別の態様としては、ホルモン抵抗性前立腺癌が挙げられ、また別の態様としては、去勢抵抗性前立腺癌が挙げられ、さらに別の態様としては転移性去勢抵抗性前立腺癌が挙げられる。

[0021] 本発明で使用されるFK330又はその塩は、国際公開02/055541号パンフレットの実施例41の化合物であり、当該特許に開示される製造方法により容易に入手できる。

[0022] FK330は不斉炭素原子の存在に基づく (S) 体の光学異性体であるが、(R) 体の光学異性体を含有していてもよい。

[0023] また、本発明においてFK330の塩とは、FK330の製薬学的に許容される塩であり、具体的には、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸等の無機酸や、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、リンゴ酸、マンデル酸、酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、ジトルオイル酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸等の有機酸、等の酸付加塩が挙げられる。これらの酸付加塩は常法の造塩反応に付すことにより製造することができる。

[0024] さらに、本発明のFK330又はその塩は、各種の水和物や溶媒和物、及び結晶多形の物質として用いることができる。また、FK330又はその塩は、種々の放射性又は非放射性同位体でラベルされた化合物も包含する。

本発明で使用されるFK330又はその塩としては、ある態様としてはフリー体無水物である。別の態様としてはフリー体2水和物である。例えば、国際公開第02/055541号パンフレットの実施例41に記載の方法により得られるFK330フリー体を、アルコール／水溶媒系、例えばエタノール／水、又はイソプロパノール／水等にて再結晶を行い、得られた結晶を減圧下乾燥させるとフリー体無水物を得ることができる。また、得られたフリー体無水物に対して調湿操作を行うことにより、フリー体2水和物結晶を得ることができる。

[0025] FK330又はその塩を有効成分として含有する医薬組成物は、当分野において通常用いられている賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用されている方法によって調製することができる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与、又は、関節内、静脈内、筋肉内等の注射剤等による非経口投与のいずれの形態であってもよい。ある態様としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等による経口投与である。

[0026] 経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられ

る。このような固体組成物においては、1種又は2種以上の有効成分を、少なくとも1種の不活性な賦形剤と混合される。組成物は、常法に従って、不活性な添加剤、例えば滑沢剤や崩壊剤、安定化剤、溶解補助剤を含有していてもよい。錠剤又は丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質のフィルムで被膜してもよい。

経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤又はエリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水又はエタノールを含む。当該液体組成物は不活性な希釈剤以外に可溶化剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

[0027] 非経口投与のための注射剤は、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤又は乳濁剤を含有する。水性の溶剤としては、例えば注射用蒸留水又は生理食塩液が含まれる。非水性の溶剤としては、例えばエタノールのようなアルコール類がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、又は溶解補助剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。また、これらは無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解又は懸濁して使用することもできる。

[0028] 投与経路、剤形、投与部位、賦形剤や添加剤の種類によって異なるが、本発明の医薬組成物は0.01～100重量%、ある態様としては0.01～50重量%の有効成分である1種またはそれ以上のFK330又はその塩を含有する。

[0029] 通常経口投与の場合、FK330（2水和物）の1日の投与量は約60～1200 mg／日であり、これを1回あるいは2回～3回に分けて投与する。別の態様としては1日の投与量として、60～200 mgである。更に別の態様としては120～250mg、120～220mg、150～250mg、又は180～200mgである。更に別の態様として、100～180mg、又は180～300mgである。更に別の態様として、120mg、130mg、140mg、150mg、160mg、170mg、180mg、190mg、200mg、210mg、220mg、230mg、240mg、又は250mgである。更に別の態様として、180mg、190mg、又は200mg

gである。投与量は症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定される。

[0030] 本発明のFK330と併用可能なタキサン系抗腫瘍剤としては、タキサン環又はその類縁構造を有する化合物を有効成分とする医薬組成物が挙げられ、別の態様としては、タキサン環を有する化合物を有効成分とする医薬組成物が挙げられる。タキサン系抗腫瘍剤のまた別の態様としては、微小管脱重合阻害作用を有する化合物を有効成分とする医薬組成物が挙げられる。医薬組成物に適用される賦形剤及び剤形は、前述したものをを用いることができる。

FK330と併用可能なタキサン系抗腫瘍剤の具体的な別の態様としては、パクリタキセル (paclitaxel)、ドセタキセル (docetaxel)、カバジタキセル (cabazitaxel)、アブラキサン (abraxane)、テセタキセル (tesetaxel)、オルタタキセル (ortataxel) 等が挙げられ、また別の態様としては、パクリタキセル (paclitaxel)、ドセタキセル (docetaxel)、又はアブラキサン (abraxane) が挙げられ、さらに別の態様としては、パクリタキセル (paclitaxel) 又はアブラキサン (abraxane) が挙げられ、またさらに別の態様としては、パクリタキセル (paclitaxel) が挙げられ、別の態様としては、ドセタキセル (docetaxel) が挙げられる。

[0031] 本発明のFK330と併用可能な主な既存タキサン系抗腫瘍剤を、主な適応癌種または適応候補癌種とともに下表に示す。但し、本発明の併用治療において、これらの抗腫瘍剤の適応癌種はこれらに限定されるものではない。

[表1]

抗腫瘍剤	主な適応（候補）癌種
パクリタキセル	卵巣癌、非小細胞肺癌、乳癌、胃（胃腺）癌、 子宮体癌
ドセタキセル	乳癌、ホルモン抵抗性前立腺癌、非小細胞肺癌、 胃（胃腺）癌、頭頸部扁平上皮癌、卵巣癌、 食道癌、子宮体癌
カバジタキセル	ホルモン抵抗性前立腺癌、
アブラキサン （パクリタキセル・アルブ ミン安定化小粒子製剤）	乳癌
テセタキセル （開発中）	乳癌、胃癌、膀胱癌、前立腺癌、メラノーマ、 大腸癌
オルタタキセル （開発中）	非小細胞肺癌、腎細胞癌、乳癌、 非ホジキンリンパ腫

[0032] パクリタキセル、ドセタキセル、カバジタキセル、又はアブラキサンは、市販品を購入して使用することが可能であり、或いは、当業者にとって自明である方法又はそれらの変法によって容易に入手可能である。

カバジタキセルは、また、国際公開96/30355号パンフレットに開示される製造方法又はそれらの変法によって容易に入手可能である。テセタキセルは、当業者にとって自明である方法、或いは、国際公開01/27115号パンフレットに開示される製造方法又はそれらの変法によって容易に入手可能である。オルタタキセルは、当業者にとって自明である方法、或いは、米国特許5705508号明細書に開示される製造方法又はそれらの変法によって容易に入手可能である。

[0033] 上記の抗腫瘍剤は既に臨床的に使用されており、その投与経路、投与サイクル、投与量は当業者に明らかである。癌種や症状、併用する薬剤によって好適な用法・用量(Dosage and Administration)は異なり、これらの詳細な情報はFDAが提供する各種データベース、例えば、“Orange Book”(http://www.fda.gov/cder/orange/default.htm)や、日本の医薬品医薬機器情報提供ホームページ (http://www.info.pmda.go.jp/) により容易に入手可能である。これ

らのデータベースにある各抗腫瘍剤の情報は本願に組み込まれるものである。

例えば、パクリタキセルの用法・用量の例としては、日本の医薬品医薬機器情報提供ホームページのタキソール注（登録商標：パクリタキセルの商品名）の添付文書には、「[効能又は効果]卵巣癌、非小細胞肺癌、乳癌、胃癌；[用法及び用量]；1. 通常、成人にはパクリタキセルとして、1日1回210mg/m²を3時間かけて点滴静注し、少なくとも3週間休薬する。これを1クールとして投与を繰り返す。なお、投与量は、年齢、症状により適宜減量する。」と記載される。

また、ドセタキセルの用法・用量の例としては、日本の医薬品医薬機器情報提供ホームページのタキソテール注（登録商標：ドセタキセルの商品名）の添付文書には、「1. 乳癌、非小細胞肺癌、胃癌、頭頸部癌；効能又は効果毎の用法及び用量；1. 通常、成人に1日1回、ドセタキセルとして60mg/m²を1時間以上かけて、3～4週間間隔で点滴静注する。なお、症状により適宜増減すること、ただし、1回最高用量は70mg/m²とする」と記載される。

[0034] 本発明における併用治療に用いる場合の治療有効用量は、通常投与される投与経路により、通常単独で投与される場合と同じ投与量若しくはそれより低用量（例えば、単独で投与した場合の最高投与量の0.10～0.99倍）に設定することができる。一定の投与サイクルで投与されるタキサン系抗腫瘍剤の場合は、FK330との併用に適するように投与サイクルを適宜調整することもできる。具体的な投与頻度、投与量、投与サイクル等は、患者の症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に依じて適宜決定される。

FK330とタキサン系抗腫瘍剤を併用投与する場合の投与形態としては、それぞれに適した投与経路、投与頻度及び投与量を採用する限りは特に限定されず、例えば、（1）FK330とタキサン系抗腫瘍剤とを含有する組成物、即ち、単一の製剤としての投与、（2）FK330とタキサン系抗腫瘍剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での同時投与、（3）FK330とタキサン系抗腫瘍剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路で

の時間差をおいての投与（例えばFK330、タキサン系抗腫瘍剤の順序での投与、あるいは逆の順序での投与）、（４）FK330とタキサン系抗腫瘍剤とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の異なる投与経路での同時投与、（５）FK330とタキサン系抗腫瘍剤とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与（例えばFK330、タキサン系抗腫瘍剤の順序での投与、あるいは逆の順序での投与）等が挙げられる。ある態様としては、本発明の癌治療用組成物はタキサン系抗腫瘍剤とは別に製剤化し、タキサン系抗腫瘍剤は静注、点滴静注若しくは経口により投与され、本発明の癌治療用組成物は経口若しくは非経口で投与される。別の態様としては、タキサン系抗腫瘍剤は静注、点滴静注により投与され、本発明の癌治療用組成物は経口で投与される。

[0035] 本発明の癌治療用組成物の好ましい投与形態は、そのタキサン系抗腫瘍剤投与の１サイクル中の少なくとも１日に本発明の癌治療用組成物を経口若しくは非経口的に投与する方法である。ここに、「サイクル」とは、一定のレジメンによる治療サイクル或いは治療クールを意味し、例えば、パクリタキセルやドセタキセルでは、投与の開始から休薬期間を経て次の投与を行う前までの３～４週間程度の投与単位期間である。ある投与形態としては、FK330またはその塩を含む本発明の癌治療用組成物を、タキサン系抗腫瘍剤の投与日の少なくとも１日に経口投与する方法、タキサン系抗腫瘍剤の投与日の全日に経口投与する方法、タキサン系抗腫瘍剤の休薬日の少なくとも１日に経口投与する方法、タキサン系抗腫瘍剤の休薬日の全日に経口投与する方法、タキサン系抗腫瘍剤の投与日の少なくとも１日及び休薬日の少なくとも１日に経口投与する方法、タキサン系抗腫瘍剤投与の１サイクル中の全日に経口投与する方法、又は、タキサン系抗腫瘍剤投与の１サイクル中に間歇的（２日に１回、１週間に１回等）に経口投与する方法である。ある態様としては、タキサン系抗腫瘍剤投与の１サイクル中の全日に経口投与する方法である。タキサン系抗腫瘍剤の投与の数日前～前日から本発明の癌治療用組成物を投与してもよく、この態様はタキサン系抗腫瘍剤の休薬日の投与に包含される。FK330とタキ

サン系抗腫瘍剤の薬物相互作用が懸念される場合は、相互作用を回避するために投与時期を分ける、及び／又は、必要な間隔を空けて投与することができる。

[0036] 本発明の「FK330又はその塩を有効成分として含有する、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤による治療を受けている対象を治療するための癌治療用組成物」又は「FK330又はその塩を有効成分として含有する、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤による治療を受けている対象を治療するための前立腺癌又は卵巣癌治療用組成物」における、「対象」は、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤による治療を受けていれば、他の抗腫瘍剤の投与を受けていてもよい。他の抗腫瘍剤は後述するものが挙げられる。「対象」は、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤を、FK330又はその塩を有効成分として含有する癌治療用組成物と同時、別々に、連続して、或いは間隔を空けて投与されていてもよい。

[0037] 本発明は、「(a) FK330又はその塩、並びに、(b) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤、を組み合わせるキット」の形態であってもよい。これは、有効成分(a)を含む製剤（第一製剤）及び有効成分(b)を含む製剤（第二製剤）を、これらの有効成分の併用療法に用いることができるように組み合わせるものである。本発明のキットは、所望により、プラセボ剤等のそれぞれの投与時期に合わせた投与を容易にする追加的な製剤や表示部材を含んでいてもよい包装品であってもよい。

2種類の製剤は、例えば、各製剤のバイオアベイラビリティ、安定性等を考慮し、それぞれの製剤に適した製剤処方、投与経路、投与頻度等の投与条件下にて、同一又は異なる投与ルートで同時、別々に、連続して、或いは間隔を空けて投与されるものである。ここで、「同時に」とは、第一製剤と第二製剤を一緒に同じ投与経路で投与することを意味し、「別々に」とは、第一製剤と第二製剤を同一若しくは異なる投与経路で、同一若しくは異なる投与頻度又は投与間隔で、別々に投与することを意味する。「連続して」とは

、第一製剤と第二製剤を同一若しくは異なる投与経路で、第一製剤に続いて第二製剤の順序、あるいは逆の順序で投与することを意味する。「間隔を空けて」とは、第一製剤と第二製剤を同一若しくは異なる投与経路で、第一製剤に続いて一定の間隔を空けて第二製剤の順序、あるいは逆の順序で投与することを意味する。

[0038] 本発明は、「(a) FK330又はその塩を有効成分として含有する組成物と、(c) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と併用することが表示された添付文書を含有してなる、癌治療用医薬品」又は「(a) FK330又はその塩を有効成分として含有する組成物と、(c) タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と併用することが表示された添付文書を含有してなる、前立腺癌又は卵巣癌治療用医薬品」の形態であってもよい。これは、併用治療に用いる場合の治療有効用量の有効成分を含有する組成物(a)と、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と併用することが表示された、前記(a)の組成物に係る添付文書(c)、の両方を含んで包装された、癌治療用の医薬品を意味する。

[0039] また、本発明のFK330又はその塩を有効成分として含有する癌治療用組成物を、タキサン系抗腫瘍剤と併用して用いる場合、所望により更に化学療法に使用される他の抗腫瘍剤を併用することもできる。更に併用することができる化学療法に使用される他の抗腫瘍剤としては、従来タキサン系抗腫瘍剤と併用することが知られている抗腫瘍剤であり、例えば、プラチナ系抗腫瘍剤、アントラサイクリン系抗腫瘍剤、シクロフォスファミド、フルオロウラシル、トラスツズマブ及びカペシタビンから選択される1以上の抗腫瘍剤が挙げられ、ある態様としては、シスプラチン若しくはカルボプラチンであり、別の態様としては、ドキソルビシンである。

[0040] 本願明細書の実施例1-6に示すように、本願発明のFK330又はその塩を有効成分として含有する癌治療用組成物とタキサン系抗腫瘍剤の併用治療により、癌治療作用が増強されることが見出された。その効果は、FK330又はその塩を有効成分として含有する癌治療用組成物若しくはタキサン系抗腫瘍剤の

単剤投与に比べて有意に平均腫瘍体積 (mean tumor volume) を減少させることにより確認された。

また、本発明のFK330又はその塩は、多くの抗腫瘍剤に報告されるような重篤な副作用を有さず、安全性の点からも有用である。

実施例に示した動物モデルでは、本発明の癌治療用組成物はタキサン系抗腫瘍剤選択的、かつ用量依存的に抗腫瘍作用を増強することが確認された。即ち、FK330又はその塩のみの場合は、有意な抗腫瘍効果が見られず、また、FK330又はその塩をタキサン以外の抗腫瘍剤と併用しても、格別顕著な抗腫瘍作用増強作用は確認されないが、タキサン系抗腫瘍剤と組み合わせた場合は良好な抗腫瘍作用増強作用が確認された。殊に、FK330は複数サイクル処置によるタキサン系薬剤の抗腫瘍効果の減弱を改善し、腫瘍増殖を良好に抑制することが示された (図7参照)。これはFK330がタキサン系抗腫瘍剤の耐性化を抑制することを示唆する。

[0041] 本願明細書の実施例7及び8には、N0が直接タキサン系抗腫瘍剤の微小管脱重合阻害作用を抑制すること、並びに、タキサン系抗腫瘍剤は、癌組織のiNOS蛋白を発現に伴うN0産生を誘発し、FK330はそのiNOS活性を抑制することが示されている。

また、本発明者らは、N0は、タキサン系抗腫瘍剤によるアポトーシスを介した癌細胞増殖抑制作用を抑制し、N0による化学療法剤の減弱効果は、タキサン系抗腫瘍剤に選択的に認められることも見出している。

従って、本発明者らは、FK330によるタキサン系抗腫瘍剤の抗腫瘍作用増強のメカニズムとして以下を明らかにした。すなわち、タキサン系抗腫瘍剤は、腫瘍組織でiNOS蛋白の発現を亢進し、その結果N0産生を増強する。産生されたN0は、タキサンの微小管脱重合阻害作用を直接的に抑制することでタキサン系抗腫瘍剤の抗腫瘍効果の減弱を引き起こす。一方、FK330は、タキサン系抗腫瘍剤によって増強されたN0産生を阻害することにより、タキサン系抗腫瘍剤の効果の減弱を抑制して抗腫瘍作用を増強できることを明らかにしたものである。

以上のことから、FK330又はその塩は、微小管脱重合阻害作用をターゲットとするすべてのタキサン系抗腫瘍剤の作用を増強できるといえる。

実施例

[0042] 本発明の癌治療用組成物の有用性を示す薬理試験結果を以下に示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

1) 被験物質

FK330としてはフリー体 2 水和物を用いた。以下、FK330の投与量は当該 2 水和物の重量で表示した。ドセタキセル水和物注射剤(タキソテール (商標) 点滴静注用)はサノフィーアベンティス株式会社から購入し、ドセタキセルとして使用した。パクリタキセル注射剤 (パクリタキセル注射液「サワイ」) は沢井製薬株式会社から購入し、パクリタキセルとして使用した。塩酸イリノテカン (トポテシン (商標) 注) は第一三共株式会社から購入し、イリノテカンとして使用した。注射用ゲムシタビン塩酸塩 (ジェムザール (商標) 注射用) は日本イーライリリー株式会社から購入し、ゲムシタビンとして使用した。注射用塩酸ドキソルビン (アドリアシン (商標) 注用10) は協和醗酵工業株式会社から購入し、ドキソルビンとして使用した。カルボプラチン注射液 (パラプラチン (商標) 注射液) はブリストル・マイヤーズ株式会社から購入し、カルボプラチンとして使用した。

2) 被験物質の調製及び投与

FK330は0.5%メチルセルロース水溶液(0.5% MC)に懸濁した (20mg/mL) 。ドセタキセルは添付溶解液にて4mg/kgに調製した後、生理食塩液 (大塚製薬) で1mg/mLに希釈した。パクリタキセル、イリノテカン、ゲムシタビン、ドキソルビン及びカルボプラチンは注射用生理食塩水にてそれぞれ、1mg/mL、3 mg/mL、16mg/mL、1mg/mL及び6mg/mLに用時調製した。

3) 細胞

ヒト肺癌由来Calu 6 (HTB-56)はAmerican Type Culture Collection (VA, USA)より入手した。細胞は10%の加熱不活性化したウシ胎仔血清(FBS)が添加

されたRPMI1640培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件で培養した。トリプシンを用いて回収した細胞をPBSで 6×10^7 cells/mLに懸濁し、等量のMatrigel(商標) Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson Co. 製, Bedford, MA, USA) と混合した。

[0043] 4) 動物

5週齢の雄性ヌードマウス(CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj(nu/nu))は日本チャールスリバー社(日本、神奈川)より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染(SPF)条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積(長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.52) が111.9 から 369.3 mm³になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

5) 薬物投与および測定

投与初日をDay1としてDay29まで観察を行った。それぞれの群(n=5又は6)を以下の様に処理した。FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与(5mL/kg)し、各化学療法剤は尾静脈より静脈内ボラス投与(10mL/kg)した。

対照群：未処置

FK330単独投与群：FK330 100mg/kg を1日2回投与(bid) (200mg/kg/day、実験開始から終了時まで連日投与)

ドセタキセル単独投与群：ドセタキセル10mg/kg/day (Day1、5及び9)

パクリタキセル単独投与群：パクリタキセル10mg/kg/day (Day1から7)

イリノテカン単独投与群：イリノテカン30mg/kg/day (Day1から7)

ゲムシタビン単独投与群：ゲムシタビン160mg/kg/day (Day1、4及び7)

ドキソルビシン単独投与群：ドキソルビシン10mg/kg/day (Day1及び8)

カルボプラチン単独投与群：カルボプラチン60mg/kg/day (Day1及び2)

併用群：

FK330 100 mg/kg bid + ドセタキセル 10 mg/kg/day (Day1、5及び9)、n=6

FK330 100 mg/kg bid + パクリタキセル 10 mg/kg/day (Day1から7)、n=6

FK330 100 mg/kg bid + イリノテカン 30 mg/kg/day (Day1から7)、n=6

FK330 100 mg/kg bid + ゲムシタビン 160 mg/kg/day (Day1、4及び7)、n=6

FK330 100 mg/kg bid + ドキソルビシン 10 mg/kg/day (Day1及び8)、n=6

FK330 100 mg/kg bid + カルボプラチン 60 mg/kg/day (Day1及び2)、n=5

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与(5mL/kg)した。各化学療法剤はFK330投与後2～4時間後に尾静脈より静脈内ボラス投与(10mL/kg)した。

3～4日ごとに体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を測定した。腫瘍体積は(長径 x [短径]² x 0.52)の楕円体積の計算式より算出した。

[0044] 6) 統計解析

結果は平均値(Mean) ± 標準誤差(SEM)で示した。試験期間中、触診限界以下を完全消失(CR)として判定し、測定値は0とした。試験終了時の腫瘍体積の実測値について、単独投与群と併用群で対応のない2群間の差の検定(Student's t-test)を行い、5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはSASまたはGraphpad Prism version 5.03を用いた。

7) 結果

FK330と各種化学療法剤を併用投与した時の抗腫瘍作用を検討した。結果は図1から図6に示した。即ち、FK330とドキソルビシンの併用効果は図1に、ゲムシタビンとの併用効果は図2に、イリノテカンとの併用効果は図3に、カルボプラチンとの併用効果は図4に、パクリタキセルとの併用効果は図5に、ドセタキセルとの併用効果は図6にそれぞれ示した。FK330単独では抗腫瘍効果は認められなかったものの、抗腫瘍効果の有意な増強がパクリタキセル(Day29でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率57.6%)及びドセタキセル(Day29でのドセタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率65.2%)で確認された。一方、FK330はゲムシタビン及びカルボプラチンの抗腫瘍効果には影響を与えず、抗腫瘍効果の若干の増強がドキソルビシン(Day29でのドキソルビシン単独群に対する腫瘍体積減少率34.5%)及びイリノテカン(Day2

9でのイリノテカン単独群に対する腫瘍体積減少率34.1%)で観察されたが、有意な作用ではなかった。

[0045] 結果は平均値 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した(n=5から6)。*: $P < 0.03$ 、**: $P < 0.01$ は併用群を化学療法剤単独投与群と比較した時の有意差を示す。N.S.:併用群を化学療法剤単独投与群と比較した時に有意差がないことを示す (Student's t-test)。

8) 結論

FK330は、単独では抗腫瘍効果は認められなかったものの、パクリタキセル及びドセタキセルの抗腫瘍効果を増強させた。一方、イリノテカン、ゲムシタビン、ドキソルビシン及びカルボプラチンの抗腫瘍効果には影響を与えなかった。これらの結果は、FK330はタキサン系抗腫瘍剤の抗腫瘍効果を選択的に増強することを示唆するものである。

[0046] 実施例 2

1) 被験物質

FK330の用量は水和物を含む重量で表示した。パクリタキセル注射剤 (パクリタキセル注射液「サワイ」) は沢井製薬株式会社から購入し、パクリタキセルとして使用した。

2) 被験物質の調製及び投与

FK330は0.5%メチルセルロース水溶液(0.5% MC)に懸濁した (20mg/mL)。パクリタキセルは注射用生理食塩水 (大塚製薬) にて1mg/mLに用時調製した。

3) 細胞

ヒト肺癌由来Calu 6 (HTB-56)はAmerican Type Culture Collection (VA, USA)より入手した。細胞は10%の加熱不活性化したウシ胎仔血清(FBS)が添加されたRPMI1640培地を用いて、37°C、5% CO₂の条件で培養した。トリプシンを用いて回収した細胞をPBSで 6×10^7 cells/mLに懸濁し、等量のMatrigel(商標) Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson Co. 製, Bedford, MA, USA) と混合した。

[0047] 4) 動物

5週齢の雄性ヌードマウス(CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj(nu/nu))は日本チャールスリバー社(日本、神奈川)より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染(SPF)条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積(長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.52)が126.1 から 299.0 mm³になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

5) 薬物投与および測定

投与初日をDay1としてDay83まで観察を行った。それぞれの群(n=6)を以下の様に処理した。FK330は5mL/kgで強制経口投与を行い、パクリタキセルは10 mL/kgで尾静脈内投与を行った。パクリタキセルはDay1からDay7の連続投与を行った後24日間の休薬した(1サイクル)。PTXの2サイクル及び3サイクル目の投与では、それぞれDay31またはDay60から6日間連続投与した。

対照群：未処置

FK330単独投与群：FK330 100mg/kg bid (200mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与)

パクリタキセル単独投与群：パクリタキセル10mg/kg/day (1サイクルでは7日間連続投与、2サイクル以降は6日間連続投与)

併用群：

FK330 100 mg/kg bid (200mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与) + パクリタキセル 10 mg/kg/day (1サイクルでは7日間連続投与、2サイクル以降は6日間連続投与)

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与(5mL/kg)した。パクリタキセルはFK330投与後2～4時間後に尾静脈より静脈内ボラス投与(10mL/kg)した。

3～4日ごとに体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を測定した。腫瘍体積は(長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.52)の楕円体積の計算式より算出した。

[0048] 6) 統計解析

結果は平均値 (Mean) ± 標準誤差 (SEM) で示した。試験期間中、触診限界以下を完全消失 (CR) として判定し、測定値は0とした。各測定時の腫瘍体積の実測値について、単独投与群と併用群で対応のない2群間の差の検定 (Student's t-test) を行い、5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはSASを用いた。

7) 結果

FK330のパクリタキセル複数サイクル投与時の併用作用を検討した。結果は図7に示した。ヒト非小細胞肺癌 (Calu-6) 担癌マウスにおいて、複数サイクル投与するにつれてパクリタキセルの抗腫瘍効果は減弱する傾向が認められた。FK330はパクリタキセルの抗腫瘍効果を著明に増強し、Day29でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は57.6% ($P<0.01$)、Day60でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は86.1% ($P<0.01$)、Day83でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は87.6% ($P<0.01$) であった。

[0049] 結果は平均値 (Mean) ± 標準誤差 (SEM) で示した ($n=6$)。*: $P<0.01$ は併用群を化学療法剤単独投与群と比較した時の有意差を示す (Student's t-test)。

8) 結論

ヒト非小細胞肺癌 (Calu-6) 担癌マウスにおいて、パクリタキセルの抗腫瘍効果は、サイクル依存的に減弱した。一方FK330の併用は、複数サイクル投与によるパクリタキセルの抗腫瘍効果を増強し、腫瘍の再増殖を著明に抑制した。この結果は、FK330が複数サイクル処置によるタキサン系薬剤の抗腫瘍効果の減弱を改善することを示唆するものである。

[0050] 実施例3

被験物質の調製、及び細胞の調整は実施例2と同様に行った。

[0051] 1) 動物

5週齢の雄性ヌードマウス (CAnN Cg-Foxn1nu/CrLj (nu/nu)) は日本チャールスリバー社 (日本、神奈川) より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染 (SPF) 条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した

細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積（長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.52）が123.3 から 274.4 mm³になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

2) 薬物投与および測定

投与初日をDay0としてDay59まで観察を行った。それぞれの群（n=5）を以下の様に処理した。FK330は5mL/kgで強制経口投与を行い、パクリタキセルは10 mL/kgで尾静脈内投与を行った。パクリタキセルはDay0からDay5の連続投与後に21日の休薬期間を設定し、これを1サイクルとして2サイクルまで投与した。

対照群：未処置

パクリタキセル単独投与群：パクリタキセル10mg/kg/day（1サイクルではDay0から6日間連続投与、2サイクルではDay27から6日間連続投与）

併用群：

FK330 30 mg/kg bid (60 mg/kg/day) + パクリタキセル 10 mg/kg/day（1サイクルではDay0から6日間連続投与、2サイクルではDay27から6日間連続投与）

FK330 60 mg/kg bid (120 mg/kg /day) + パクリタキセル 10 mg/kg/day（1サイクルではDay0から6日間連続投与、2サイクルではDay27から6日間連続投与）

FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg /day) + パクリタキセル 10 mg/kg/day（1サイクルではDay0から6日間連続投与、2サイクルではDay27から6日間連続投与）

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与（5mL/kg）した。パクリタキセルはFK330投与後2～4時間後に尾静脈より静脈内ボラス投与（10mL/kg）した。

3～4日ごとに体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を測定した。腫瘍体積は（長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.52）の楕円体積の計算式より算出した。

[0052] 3) 結果

FK330のパクリタキセルの抗腫瘍効果増強作用の用量依存性を検討した結果を図8に示した。結果は平均値 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した (n=4から5)。試験終了時 (Day59) の腫瘍体積は、パクリタキセル単独群では $1640.1 \pm 902.8 \text{ mm}^3$ 、FK330 30mg/kg bid併用群では $955.9 \pm 231.0 \text{ mm}^3$ 、FK330 60mg/kg bid併用群では $706.2 \pm 256.1 \text{ mm}^3$ 、FK330 100mg/kg bid併用群では $297.9 \pm 101.4 \text{ mm}^3$ であり、FK330は用量依存的にパクリタキセルの抗腫瘍効果を増強した (パクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率 : FK330 30mg/kg bidでは41.7%、FK330 60mg/kg bidでは56.9%、FK330 100mg/kg bidでは81.8%)。

4) 結論

FK330の併用は、用量依存的にパクリタキセルの抗腫瘍効果を増強した。

[0053] 実施例4

被験物質の調製、及び細胞の調整は実施例2と同様に行った。

[0054] 1) 動物

5週齢の雄性ヌードマウス (CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj (nu/nu)) は日本チャールスリバー社 (日本、神奈川) より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染 (SPF) 条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を $3 \times 10^6 \text{ cells}/0.1 \text{ mL/mouse}$ でヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積 (長径 $\times$ [短径] $^2 \times 0.52$) が142.1 から 323.7 mm^3 になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

2) 薬物投与および測定

投与初日をDay0としてDay55まで観察を行った。それぞれの群 (n=5又は6) を以下の様に処理した。FK330は5mL/kgで強制経口投与を行い、パクリタキセルは10mL/kgで尾静脈内投与を行った。パクリタキセルはDay0からDay5の連続投与後に21日の休薬期間を設定し、Day27からDay31まで5日間連続投与した。

対照群 : 未処置

パクリタキセル単独投与群 : パクリタキセル10mg/kg/day (Day0からDay5及び

Day27からDay31)

併用群：

同時投与FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg /day) + パクリタキセル 10 mg/kg/day (Day0からDay5及びDay27からDay31)

順次投与FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg /day) + パクリタキセル 10 mg/kg/day (Day0からDay5及びDay27からDay31)

連続投与FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg /day) + パクリタキセル 10 mg/kg/day (Day0からDay5及びDay27からDay31)

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与(5mL/kg)した。同時投与ではFK330はパクリタキセルの投与日に(Day0からDay5及びDay27からDay31)、連続投与ではパクリタキセル投与日後の休薬日に(Day6からDay26及びDay32からDay55)、連続投与は実験開始日から実験終了日までの全日に投与した。パクリタキセルはFK330投与後2から4時間後に尾静脈より静脈内ボラス投与(10mL/kg)した。

3から4日ごとに体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を測定した。腫瘍体積は(長径 x [短径]² x 0.52)の楕円体積の計算式より算出した。

[0055] 3) 結果

ヒト非小細胞肺癌(Calu-6)担癌マウスにおいて、パクリタキセル併用におけるFK330の投与タイミングを検討した結果を図9に示した。結果は平均値(Mean) ± 標準誤差(SEM)で示した(n=5又は6)。

試験期間中、触診限界以下を完全消失(CR)として判定し、測定値は0とした。試験終了時(Day55)の腫瘍体積は、パクリタキセル単独群では1229.2 ± 289.6 mm³、パクリタキセルとFK330の同時投与では、559.8 ± 161.8 mm³、FK330の順次投与では1150.9 ± 264.9 mm³、FK330の連続投与では168.5 ± 66.0 mm³であり、それぞれ、パクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は、54.5%、6.4%及び86.3%であった。

4) 結論

FK330の投与タイミングはタキサン系薬剤の投与開始日よりサイクル期間中

連日投与した場合が最も併用効果が高いことが示唆された。

[0056] 実施例 5

被験物質の調製は実施例 2 と同様に行った。

1) 細胞

ヒト胃癌由来NCI-N87 (CRL-5822) はAmerican Type Culture Collection (VA, USA)より、MKN-28 (JCRB0253) は医薬基盤研究所 (HSRRB) より、AZ-521 (RCB2087) は理研BRCより入手したものを使用した。NCI-N87及びMKN-28細胞は10%の加熱不活性化したウシ胎仔血清(FBS)が添加されたRPMI1640培地を用いて、AZ-521は10%の加熱不活性化したFBSを含むDMEM培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件で培養した。トリプシンを用いて回収した細胞をPBSで 6×10^7 cells/mLに懸濁し、等量のMatrigel(商標) Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson Co. 製, Bedford, MA, USA)と混合した。

[0057] 2) 動物

5週齢の雄性ヌードマウス(CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj(nu/nu))は日本チャールスリバー社(日本、神奈川)より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染(SPF)条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。AZ-521担癌マウスでは腫瘍体積(長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.52)が386.6から766.6 mm³に、MKN-28担癌マウスでは腫瘍体積が186.0から319.2 mm³に、NCI-N87担癌マウスでは腫瘍体積が192.1から364.2になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

3) 薬物投与および測定

投与初日をDay0として、AZ-521担癌マウスではDay46まで、MKN-28担癌マウスではDay84まで、NCI-N87担癌マウスではDay56まで観察を行った。それぞれの群(n=5又は6)を以下の様に処理した。FK330は5mL/kgで強制経口投与を行い、パクリタキセルは10mL/kgで尾静脈内投与を行った。パクリタキセルは下記の条件にて複数サイクル投与した。

対照群：未処置

FK330単独投与群：FK330 100mg/kg bid (200mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与)

パクリタキセル単独投与群：パクリタキセル10mg/kg/day

AZ-521担癌マウス：

パクリタキセルをDay0～Day5まで6日間連続投与を行った後22日間の休薬期間を置き（1サイクル）、パクリタキセルをDay28～Day32まで5日間連続投与した（2サイクル）。

MKN-28担癌マウス：

パクリタキセルをDay0からDay5まで6日間連続投与を行った後22日間の休薬期間の後、Day28からDay32の5日間連続投与し23日間の休薬期間をおいた（2サイクル）。さらに、Day56からDay60の5日間の連続投与をおこなった（3サイクル）。

NCI-N87担癌マウス：

パクリタキセルをDay0からDay5まで6日間連続投与を行った後26日間の休薬期間の後、Day32からDay36の5日間連続投与した（2サイクル）。

併用群：

FK330 100 mg/kg bid (200mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与) + パクリタキセル 10 mg/kg/day

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与（5mL/kg）した。パクリタキセルはFK330投与後2から4時間後に尾静脈より静脈内ボラス投与（10mL/kg）した。

3から4日ごとに体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を測定した。腫瘍体積は（長径 × [短径]² × 0.52）の楕円体積の計算式より算出した。

4) 統計解析

結果は平均値（Mean）±標準誤差（SEM）で示した。各測定時の腫瘍体積の実測値について、単独投与群と併用群で対応のない2群間の差の検定（Student's t-test）を行い、5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。

[0058] 5) 結果

ヒト胃癌 (AZ-521、MKN-28、NCI-N87) 担癌マウスにおいて、FK330のパクリタキセルとの併用効果を検討した結果を図 10 から図 12 に示した。即ち、AZ-521担癌マウスにおけるFK330とパクリタキセルの併用効果を図 10 に、MKN-28担癌マウスにおける併用効果を図 11 に、NCI-N87担癌マウスにおける併用効果を図 12 にそれぞれ示した。ヒト非小細胞肺癌担癌マウスと同様に、FK330はパクリタキセルの抗腫瘍効果を増強した。AZ-521担癌マウスにおいて、実験最終日のパクリタキセル単独群の腫瘍体積は $3285.4 \pm 359.4 \text{ mm}^3$ 、パクリタキセルとFK330の併用群では $795.0 \pm 223.3 \text{ mm}^3$ であり、パクリタキセル単独群に対して腫瘍体積が75.8% ($P < 0.01$) 減少した。MKN-28並びにNCI-N87担癌マウスにおいても、FK330はパクリタキセルの抗腫瘍効果を増強した (MKN-28担癌マウス: $454.1 \pm 147.5 \text{ mm}^3$ vs $164.8 \pm 18.5 \text{ mm}^3$ 、63.7%減少、 $P = 0.08$ 、NCI-N87担癌マウス: $492.0 \pm 48.5 \text{ mm}^3$ vs $223.9 \pm 85.1 \text{ mm}^3$ 、54.5%減少、 $P < 0.03$)。

[0059] 結果は平均値 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した ($n=5$ 又は 6)。P値は併用群を化学療法剤単独投与群と比較した時の有意差を示す (Student's t-test)。

6) 結論

FK330の併用は、ヒト胃癌担癌モデルにおいてパクリタキセルの抗腫瘍効果を増強し、殊に、複数サイクル処置によるパクリタキセルの抗腫瘍効果の減弱を改善する効果が認められた。

[0060] 実施例 6

1) 被験物質

FK330の用量は単体 (非水和物) 重量に換算して表示した。パクリタキセルはLC Laboratories社 (Woburn, MA, USA) から購入し、パクリタキセルとして使用した。

2) 被験物質の調製及び投与

FK330は0.5%メチルセルロース水溶液 (0.5% MC) に懸濁し (20mg/mL)、経口

投与した。パクリタキセルは、エタノール/クレモフォル溶液（1:1で混合）にて10 mg/mLのストック溶液を調製した後、投与直前に注射用生理食塩水（大塚製薬）にて1mg/mLに希釈して尾静脈内投与した。

3) 細胞

ヒト乳癌由来MDA-MB-231(HTB-26)はAmerican Type Culture Collection(VA, USA)より入手した。細胞は10%の加熱不活性化したウシ胎仔血清(FBS)が添加されたDMEM培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件で培養した。トリプシンを用いて回収した細胞をPBSで 6×10^7 cells/mLに懸濁し、等量のMatrigel(商標) Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson社, Bedford, MA, USA)と混合した。

[0061] 4) 動物

5週齢の雌性ヌードマウス(CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj(nu/nu))は日本チャールスリバー社（日本、神奈川）より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染(SPF)条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積（長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.5）が148.7から312.5 mm³になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

5) 薬物投与および測定

投与初日をDay1としてDay66まで観察を行った。それぞれの群（n=6）を以下のように処理した。FK330は5 mL/kgで強制経口投与を行い、パクリタキセルは10 mL/kgで尾静脈内投与を行った。パクリタキセルは、Day1からDay4までの4日間連続投与を行った後、25日間の休薬を行った（1サイクル）。PTXの2サイクル目の投与では、Day30から4日間連続投与した。

対照群：未処置

FK330単独投与群：FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与)

パクリタキセル単独投与群：パクリタキセル10 mg/kg/day（各サイクル4日間

連続投与)

併用群：

FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与) + パクリタキセル 10 mg/kg/day (各サイクル4日間連続投与)

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与 (5 mL/kg) した。パクリタキセルはFK330投与後1～4時間後に尾静脈より静脈内ボラス投与 (10 mL/kg) した。

体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を週2回測定した。腫瘍体積は (長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.5) の楕円体積の計算式より算出した。

[0062] 6) 統計解析

結果は平均値 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した。試験期間中、触診限界以下を完全消失 (CR) として判定し、測定値は0とした。各測定時の腫瘍体積の実測値を用い、単独投与群と併用群の比較について、対応のない2群間の差の検定 (Student's t-test) を行った。5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。

7) 結果

ヒト乳癌担癌マウスにおけるFK330のパクリタキセルとの併用効果を検討した結果を図13に示した。ヒト乳癌 (MDA-MB-231) 担癌マウスにおいて、FK330はパクリタキセルの抗腫瘍効果を著明に増強し、Day28でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は59.6% ($P < 0.01$)、Day66でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は82.8% ($P < 0.01$) であった。

[0063] 結果は平均値 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した ($n=6$)。*: $P < 0.01$ は併用群をパクリタキセル単独投与群と比較した時の有意差を示す (Student's t-test)。

8) 結論

ヒト乳癌 (MDA-MB-231) 担癌マウスにおいて、FK330の併用は、複数サイクル投与によるパクリタキセルの抗腫瘍効果を増強し、腫瘍の再増殖を著明に抑制した。

[0064] 実施例 7

1) 被験物質

NO供与体であるS-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine(SNAP)はCayman Chemical社(Ann Arbor, MI, USA) から購入したものを使用した。チューブリン重合測定キットはCytoskeleton社(Denver, CO, USA)から購入し使用した。パクリタキセルは、測定キットに同封されているパクリタキセルをパクリタキセルとして使用した。ドセタキセルはSigma-Aldrich社(St. Louis, MO, USA)から購入し、ドセタキセルとして使用した。

2) 試験方法

蛍光法によるチューブリン重合反応測定は、キットの説明書に従い実施した。即ち、精製ブタ脳由来チューブリン(最終濃度2 mg/mL)とSNAP(最終濃度200または500 $\mu\text{mol/L}$)をキットに同封されている緩衝液中で15分以上、室温でインキュベートした。次にパクリタキセル(最終濃度3 $\mu\text{mol/L}$)またはドセタキセル(最終濃度1 $\mu\text{mol/L}$)、及びGPT (最終濃度1mmol/L) をこの緩衝液に加え、37℃で60分間インキュベートした。このインキュベーションの間、マイクロプレートリーダー (SpectraMax社, Molecular Devices社, Sunnyvale, CA, USA)にて蛍光強度 (測定波長: 励起350 nm/蛍光435 nm) を1分毎に測定した。蛍光強度の値は、平衡定常期に当たる反応開始60分後の値を用い、SNAP及びタキサン未処置群に対する百分率で示し、3回施行した平均値をその値とした。

[0065] 3) 統計解析

結果は、独立した5回の実験の平均値 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した。パクリタキセルまたはドセタキセル処置群と未処置群の比較は、対応のない2群間の差の検定 (Student's t-test)を行った。タキサン系薬剤処置及び未処置におけるSNAP未処置群 (対照群) とSNAP処置群 (200及び500 $\mu\text{mol/L}$) の比較は、Dunnett's多重比較検定を行った。5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。

4) 結果

パクリタキセル誘発チューブリン重合作用に対するSNAPの抑制作用の代表例、及びチューブリン重合開始後60分の集計値を図14のA)及びB)に、ドセタキセル誘発チューブリン重合に対するSNAPの抑制作用の代表例、及びチューブリン重合開始後60分の集計値を図15のA)及びB)に、それぞれ示した。パクリタキセルまたはドセタキセルは、各タキサン未処置に比較してチューブリン重合をそれぞれ、152.7% ($P<0.05$) 及び184.1% ($P<0.001$) 有意に促進した。NO供与体であるSNAPは、パクリタキセル及びドセタキセルにより促進されたチューブリン重合反応を有意に抑制した。また、SNAPは自然に惹起されるチューブリン重合反応も有意に抑制した。

[0066] 結果は平均値 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した ($n=5$)。#: $P<0.05$ 及び## #: $P<0.001$ は、パクリタキセルまたはドセタキセル処置群と各タキサン薬剤未処置群を比較したときの有意差を示す (Student's t-test)。\$: $P<0.05$ 及び\$\$\$: $P<0.001$ は、タキサン未処置における、SNAP未処置群 (対照群) に対するSNAP処置群の有意差を示す (Dunnett's 多重比較検定)。*: $P<0.05$ 、**: $P<0.01$ 及び***: $P<0.001$ は、タキサン処置における、SNAP未処置群 (対照群) に対するSNAP処置群の有意差を示す (Dunnett's 多重比較検定)。

5) 結論

NO供与体は、パクリタキセル及びドセタキセルにより促進されたチューブリン重合反応を直接抑制した。

[0067] 実施例 8

1) 被験物質

FK330の用量は単体 (非水和物) 重量に換算して表示した。パクリタキセル注射剤 (パクリタキセル注射液「サワイ」) は沢井製薬株式会社から購入し、パクリタキセルとして使用した。ラット抗マウスF4/80抗原モノクローナル抗体、ウサギ抗iNOSポリクローナル抗体、及びウサギ抗ニトロチロシン抗体は、それぞれAbD Serotec社 (Oxford, UK)、Santa Cruz Biotechnology社 (Santa Cruz, CA, US)、及びMillipore社 (Billerica, MA, USA) から購入したものを使用した。

2) 被験物質の調製及び投与

FK330は0.5%メチルセルロース水溶液(0.5% MC)に懸濁し(20mg/mL)、経口投与した。パクリタキセルは、注射用生理食塩水(大塚製薬)にて1mg/mLに用時調製した。

3) 細胞

ヒト肺癌由来Calu-6(HTB-56)はAmerican Type Culture Collection(VA, USA)より入手した。細胞は10%の加熱不活性化したウシ胎仔血清(FBS)が添加されたRPMI1640培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件で培養した。トリプシンを用いて回収した細胞をPBSで 6×10^7 cells/mLに懸濁し、等量のMatrigel(商標) Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson社, Bedford, MA, USA)と混合した。

4) 動物

5週齢の雄性ヌードマウス(CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj(nu/nu))は日本チャールスリバー社(日本、神奈川)より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染(SPF)条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積(長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.5)が136.8 から 248.5 mm³になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

5) 薬物投与

薬物投与は、投与初日(Day 1)より開始した。それぞれの群(n=5)を以下の様に処理した。FK330は5mL/kgで強制経口投与をDay 1からDay 6まで、パクリタキセルは10mL/kgで尾静脈内投与をDay 1からDay 5まで行った。

対照群：未処置

FK330単独投与群：FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg/day、Day 1からDay 6)

パクリタキセル単独投与群：パクリタキセル10 mg/kg/day (Day 1からDay 5)

併用群：FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg/day、Day 1からDay 6) + パクリ

タキセル 10 mg/kg/day (Day 1からDay 5)

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与 (5 mL/kg) した。パクリタキセルはFK330投与後1〜4時間後に尾静脈より静脈内ボラス投与 (10 mL/kg) した。

6) 組織固定及び凍結ブロック作成

Day 6にマウスより腫瘍組織を採材した。4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液 (和光純薬工業株) にて、4°Cで12時間浸潤固定を行った。組織固定度、10%、15%及び20%スクロース/リン酸緩衝液を用い、常法に従い、4°Cで段階的にスクロース置換した。置換終了後、O.C.T. コンパウンド (Toronto Research Chemicals社, Toronto, Canada) 中に癌組織を包埋し、ドライアイス/アセトンにて凍結ブロックを作成し、-80°Cで保存した。

7) 免疫化学染色及び画像解析

5 μ mの薄さの凍結切片をクライオスタット (サクラファインテックジャパン株式会社) にて作成し、風乾した。4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液で乾燥させた凍結切片を洗浄後、内因性ペルオキシダーゼを失活化させるため、0.3%過酸化水素/メタノールで切片を30分間処理した。マウスマクロファージ、iNOS及びニトロチロシン染色は以下の手順により行った。iNOS及びニトロチロシン染色に関しては、免疫化学染色を行う前に、マイクロウェーブ (3分/500 W) により抗原賦活化を行った。

マウスマクロファージ染色：

一次抗体処理：ラット抗マウスF4/80抗原モノクローナル抗体 (1:200希釈) と60分間、室温でインキュベーションした。

二次抗体処理：ビオチン化抗ラットIgG抗体 (1:100希釈, vector laboratories社) と30分間、室温でインキュベーションした。

検出系：VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories社) を用い、切片を30分間、室温でインキュベーションした。

発色：3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB, Dako社) 試薬を用い、室温で1分間処理した。

iNOS染色：

一次抗体処理：ウサギ抗iNOSポリクローナル抗体（1:500希釈）と一昼夜、4℃でインキュベーションした。

検出系：EnVision (DAKO;)を用い、切片を30分間、室温でインキュベーションした。

発色：DAB試薬を用い、室温で1分間処理した。

ニトロチロシン染色：

一次抗体処理：ウサギ抗ニトロチロシン抗体（1:500希釈）と一昼夜、4℃でインキュベーションした。

検出系：EnVision (DAKO;)を用い、切片を30分間、室温でインキュベーションした。

発色：DAB試薬を用い、室温で1分間処理した。

染色した画像（F4/80染色画像及びiNOS画像は200倍、ニトロチロシン染色画像は400倍）は顕微鏡を介しコンピュータに取り込み、WinROOF（version 5.7）を搭載した画像解析システム（三谷商事株式会社）により解析した。値は、総面積当たりの陽性面積の比（%）で表した。各切片当たり5視野を計測し、その平均値を値とした。

[0068] 8) 統計解析

結果は平均値（Mean）±標準誤差（SEM）で示した。腫瘍組織内iNOS蛋白発現、マクロファージ（F4/80）浸潤、及びニトロチロシン（NOの主な最終生成物）の各測定値について、対照群とパクリタキセル単独群、FK330単独群、またはパクリタキセル及びFK330併用群の比較、並びにパクリタキセル単独群とパクリタキセル及びFK330併用群の比較について、対応のない2群間の差の検定（Student's t-test）を行った。5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。

9) 結果

ヒト肺癌細胞株Calu-6担癌マウスにおけるパクリタキセル単独及びFK330併用時の腫瘍組織内iNOS蛋白発現、マクロファージ（F4/80）浸潤、及びニトロ

チロシン（NOの主な最終生成物）発現に対する作用を、図16乃至18に示した。対照群の腫瘍組織内には、iNOS陽性細胞並びにマクロファージは殆ど認められず、ニトロチロシン（NOの最終生成物）も低かった。一方、パクリタキセル投与により、腫瘍組織内へのマクロファージの浸潤が著明に認められた。また、腫瘍組織内iNOS蛋白発現も著明に亢進、その結果、腫瘍組織内ニトロチロシン量も増加した。iNOS阻害剤であるFK330の併用は、腫瘍内マクロファージ浸潤及びiNOS蛋白発現には作用を及ぼさなかったものの、ニトロチロシン産生を抑制した。

[0069] 結果は平均値（Mean）±標準誤差（SEM）で示した（n=5）。***: $P < 0.001$ は、対照群と比較したときの有意差を示す（Student's t-test）。

10) 結論

ヒト肺癌（Calu-6）担癌マウスにおいて、パクリタキセルは、腫瘍組織内へのマクロファージの浸潤、及び腫瘍組織内iNOS蛋白発現を誘発し、その結果、腫瘍内NO産生を誘発した。iNOS阻害剤であるFK330の併用は、パクリタキセルにより誘発されるiNOS由来NO産生を抑制した。

[0070] 実施例9

1) 被験物質

FK330の用量は単体（非水和物）重量に換算して表示した。パクリタキセルはLC Laboratories社(Woburn, MA, USA)から購入し、パクリタキセルとして使用した。

2) 被験物質の調製及び投与

FK330は0.5%メチルセルロース水溶液(0.5% MC)に懸濁し（20 mg/mL）、経口投与した。パクリタキセルは、エタノール/クレモフォール溶液（1:1で混合）にて10 mg/mLのストック溶液を調製した後、投与直前に注射用生理食塩水（大塚製薬）にて1mg/mLに希釈して尾静脈内投与した。

3) 細胞

ヒトホルモン抵抗性前立腺癌由来PC-3(CRL-1435)はAmerican Type Culture Collection(VA, USA)より入手した。細胞は10%の加熱不活性化したウシ胎仔

血清(FBS)が添加されたDMEM培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件で培養した。

トリプシンを用いて回収した細胞をPBSで 6×10^7 cells/mLに懸濁し、等量のMatrigel(商標) Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson社, Bedford, MA, USA)と混合した。

[0071] 4) 動物

5週齢の雄性ヌードマウス(CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj(nu/nu))は日本チャールスリバー社(日本、神奈川)より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染(SPF)条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積が156.0から300.1 mm³になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

5) 薬物投与および測定

投与初日をDay0としてDay55まで観察を行った。それぞれの群(n=6)を以下のように処理した。FK330は5 mL/kgで強制経口投与を行い、パクリタキセルは10 mL/kgで尾静脈内投与を行った。パクリタキセルは、Day0からDay4までの5日間連続投与を行った後、25日間の休薬を行った(1サイクル)。パクリタキセルの2サイクル目の投与では、Day30から4日間連続投与した。

対照群：未処置

FK330単独投与群：FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与)

パクリタキセル単独投与群：パクリタキセル10 mg/kg/dayをDay0～Day4まで5日間連続投与を行った後25日間の休薬期間を置き(1サイクル)、パクリタキセルをDay30～Day33まで4日間連続投与した(2サイクル)。

併用群：

FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与) + パクリタキセル 10 mg/kg/day (1サイクル目は5日間連続投与、2サイクル目では4日間連続投与)。

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与(5 mL/kg)した。パク

リタキセルはFK330投与後1～4時間に尾静脈より静脈内ボラス投与（10 mL/kg）した。

体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を週2回測定した。腫瘍体積は（長径 x [短径]² x 0.5）の楕円体積の計算式より算出した。

[0072] 6) 統計解析

結果は平均値（Mean）±標準誤差（SEM）で示した。試験期間中、触診限界以下を完全消失（CR）として判定し、測定値は0とした。各測定時の腫瘍体積の実測値を用い、単独投与群と併用群の比較について、対応のない2群間の差の検定（Student's t-test）を行った。5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。

7) 結果

ヒトホルモン抵抗性前立腺癌におけるFK330のパクリタキセルとの併用効果を検討した結果を図19に示した。ヒト前立腺癌（PC-3）担癌マウスにおいて、FK330はパクリタキセルの抗腫瘍効果を著明に増強し、Day30でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は63.1%（ $P<0.05$ ）、Day55でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は72.1%（ $P<0.001$ ）であった。

[0073] 結果は平均値（Mean）±標準誤差（SEM）で示した（ $n=6$ ）。*: $P<0.05$, ***: $P<0.001$ は併用群をパクリタキセル単独投与群と比較した時の有意差を示す（Student's t-test）。

8) 結論

ヒトホルモン抵抗性前立腺癌（PC-3）担癌マウスにおいて、FK330の併用は、複数サイクル投与によるパクリタキセルの抗腫瘍効果を増強し、腫瘍の再増殖を著明に抑制した。

[0074] 実施例10

1) 被験物質

FK330の用量は単体（非水和物）重量に換算して表示した。ドセタキセル（ドセタキセル水和物注射剤（タキソテール（商標）点滴静注用））は、サノフィーアベンティス株式会社から購入し、ドセタキセルとして使用した。

2) 被験物質の調製及び投与

FK330は0.5%メチルセルロース水溶液(0.5% MC)に懸濁し(20 mg/mL)、経口投与した。ドセタキセル(40 mg/mL)は、95%エタノールにて20mg/mLに調製した後、投与直前に注射用生理食塩水(大塚製薬)にて1 mg/mLに希釈して尾静脈内投与した。

3) 細胞

ヒトホルモン抵抗性前立腺癌由来PC-3(CRL-1435)はAmerican Type Culture Collection(VA, USA)より入手した。細胞は10%の加熱不活性化したウシ胎仔血清(FBS)が添加されたDMEM培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件で培養した。トリプシンを用いて回収した細胞をPBSで 6×10^7 cells/mLに懸濁し、等量のMatrigel(商標) Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson社, Bedford, MA, USA)と混合した。

[0075] 4) 動物

5週齢の雄性ヌードマウス(CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj(nu/nu))は日本チャールスリバー社(日本、神奈川)より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染(SPF)条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積が152.1から301.2 mm³になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

5) 薬物投与および測定

投与初日をDay0としてDay51まで観察を行った。それぞれの群(n=5~6)を以下の様に処理した。FK330は5 mL/kgで強制経口投与を行い、ドセタキセルは10 mL/kgで尾静脈内投与を行った。ドセタキセルは、Day0及びDay1の2日間連続投与を行った後、25日間の休薬を行った(1サイクル)。ドセタキセルの2サイクル目の投与では、Day27から2日間連続投与した。

対照群：未処置

FK330単独投与群：FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与)

ドセタキセル単独投与群：ドセタキセル10 mg/kg/dayをDay0及びDay1の2日間連続投与を行った後25日間の休薬期間を置き（1サイクル）、ドセタキセルをDay27から2日間連続投与した（2サイクル）

併用群：

FK330 100 mg/kg bid（200 mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与） + ドセタキセル 10 mg/kg/day（各サイクル2日間連続投与）

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与（5 mL/kg）した。ドセタキセルはFK330投与後1～4時間に尾静脈より静脈内ボラス投与（10 mL/kg）した。

体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を週2回測定した。腫瘍体積は（長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.5）の楕円体積の計算式より算出した。

[0076] 6) 統計解析

結果は平均値（Mean） $\pm$ 標準誤差（SEM）で示した。試験期間中、触診限界以下を完全消失（CR）として判定し、測定値は0とした。各測定時の腫瘍体積の実測値を用い、単独投与群と併用群の比較について、対応のない2群間の差の検定（Student's t-test）を行った。5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。

7) 結果

ヒトホルモン抵抗性前立腺癌におけるFK330のドセタキセルとの併用効果を検討した結果を図20に示した。ヒト前立腺癌（PC-3）担癌マウスにおいて、FK330はドセタキセルの抗腫瘍効果を著明に増強し、Day27でのドセタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は49.3%（ $P=0.062$ ）、Day51でのドセタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は42.0%（ $P<0.05$ ）であった。

[0077] 結果は平均値（Mean） $\pm$ 標準誤差（SEM）で示した（ $n=5\sim6$ ）。*： $P<0.05$ は併用群をドセタキセル単独投与群と比較した時の有意差を示す（Student's t-test）。

8) 結論

ヒトホルモン抵抗性前立腺癌（PC-3）担癌マウスにおいて、FK330の併用は

、複数サイクル投与によるドセタキセルの抗腫瘍効果を増強した。

[0078] 実施例 1 1

1) 被験物質

FK330の用量は単体（非水和物）重量に換算して表示した。ドセタキセル（ドセタキセル水和物注射剤（タキソテール（商標）点滴静注用））は、サノフィーアベンティス株式会社から購入し、ドセタキセルとして使用した。

2) 被験物質の調製及び投与

FK330は0.5%メチルセルロース水溶液(0.5% MC)に懸濁し（20 mg/mL）、経口投与した。ドセタキセル（40 mg/mL）は、95%エタノールにて20 mg/mLに調製した後、投与直前に注射用生理食塩水（大塚製薬）にて1.5 mg/mLに希釈して尾静脈内投与した。

3) 細胞

ヒト乳癌由来MDA-MB-468(HTB-132)はAmerican Type Culture Collection(VA, USA)より入手した。細胞は10%の加熱不活性化したウシ胎仔血清(FBS)が添加されたRPMI1640培地を用いて、37℃、5% CO₂の条件で培養した。トリプシンを用いて回収した細胞をPBSで 6×10^7 cells/mLに懸濁し、等量のMatrigel(商標) Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson社, Bedford, MA, USA)と混合した。

[0079] 4) 動物

5週齢の雌性ヌードマウス(CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj(nu/nu))は日本チャールスリバー社（日本、神奈川）より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染(SPF)条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積が133.2から326.5 mm³になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

5) 薬物投与および測定

投与初日をDay0としてDay65まで観察を行った。それぞれの群(n=6)を以下のように処理した。FK330は5 mL/kgで強制経口投与を行い、ドセタキセルは10 mL

/kgで尾静脈内投与を行った。ドセタキセルは、Day0に投与を行った後に36日間休薬（1サイクル）し、Day37に再度投与した（2サイクル）。

対照群：未処置

FK330単独投与群：FK330 100 mg/kg bid（200 mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与）

ドセタキセル単独投与群：ドセタキセル15 mg/kg/dayをDay0におこなった後、36日間の休薬期間を置き（1サイクル）、ドセタキセルをDay37に再度投与した（2サイクル）。

併用群：

FK330 100 mg/kg bid + ドセタキセル 15 mg/kg/day。

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与（5 mL/kg）した。ドセタキセルはFK330投与後1～4時間に尾静脈よりボラス投与（10 mL/kg）した。

体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を週2回測定した。腫瘍体積は（長径 $\times$ [短径]² $\times$ 0.5）の楕円体積の計算式より算出した。

[0080] 6) 統計解析

結果は平均値（Mean） $\pm$ 標準誤差（SEM）で示した。試験期間中、触診限界以下を完全消失（CR）として判定し、測定値は0とした。各測定時の腫瘍体積の実測値を用い、単独投与群と併用群の比較について、対応のない2群間の差の検定（Student's t-test）を行った。5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。

7) 結果

ヒト乳癌担癌モデルにおけるFK330のドセタキセルとの併用効果を検討した結果を図21に示した。ヒト乳癌（MDA-MB-468）担癌マウスにおいて、FK330はドセタキセルの抗腫瘍効果を著明に増強し、Day37でのドセタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は46.6%（ $P<0.05$ ）、Day65でのドセタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は76.6%（ $P<0.01$ ）であった。

[0081] 結果は平均値（Mean） $\pm$ 標準誤差（SEM）で示した（ $n=6$ ）。*： $P<0.05$ ，**：

$P < 0.01$ は併用群をドセタキセル単独投与群と比較した時の有意差を示す (Student's t-test)。

8) 結論

ヒト乳癌 (MDA-MB-468) 担癌マウスにおいて、FK330の併用は、複数サイクル投与によるドセタキセルの抗腫瘍効果を増強し、腫瘍の再増殖を著明に抑制した。

[0082] 実施例 1 2

1) 被験物質

FK330の用量は単体 (非水和物) 重量に換算して表示した。パクリタキセルはLC Laboratories社 (Woburn, MA, USA) から購入し、パクリタキセルとして使用した。

2) 被験物質の調製及び投与

FK330は0.5%メチルセルロース水溶液 (0.5% MC) に懸濁し (20 mg/mL)、経口投与した。パクリタキセルは、エタノール/クレモフォール溶液 (1:1で混合) にて10 mg/mLのストック溶液を調製した後、投与直前に注射用生理食塩水 (大塚製薬) にて1 mg/mLに希釈して尾静脈内投与した。

3) 細胞

ヒト卵巣癌由来MCAS (JCRB0240) は医薬基盤研究所 (HSRRB) より入手したものを使用した。細胞は20%の加熱不活性化したウシ胎仔血清 (FBS) が添加されたEMEM培地を用いて、37°C、5% CO₂の条件で培養した。トリプシンを用いて回収した細胞をPBSで 6×10^7 cells/mLに懸濁し、等量のMatrigel (商標) Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson社, Bedford, MA, USA) と混合した。

[0083] 4) 動物

5週齢の雌性ヌードマウス (CAnN Cg-Foxn1nu/CrLCrLj (nu/nu)) は日本チャールスリバー社 (日本、神奈川) より購入した。動物は試験期間を通じて特定病原体未感染 (SPF) 条件下で標準的な飼料と飲水を与えて飼育した。培養した細胞を 3×10^6 cells/0.1 mL/mouseでヌードマウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積が144.7から302.7 mm³になったヌードマウスを群間および群内の腫瘍体

積ばらつきが小さくなるようにSASを用いて群分けした。

5) 薬物投与および測定

投与初日をDay0としてDay91まで観察を行った。それぞれの群 (n=6)を以下の様に処理した。FK330は5 mL/kgで強制経口投与を行い、パクリタキセルは10 mL/kgで尾静脈内投与を行った。パクリタキセルは、Day0からDay4の5日間連続投与を行った後、24日間の休薬を行った (1サイクル)。パクリタキセルの2サイクル目の投与をDay29から5日間連続で行った。29日間の休薬後パクリタキセルの3サイクル目の投与を、Day63から5日間連続で行った。

対照群：未処置

FK330単独投与群：FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与)

パクリタキセル単独投与群：パクリタキセル10 mg/kg/dayをDay0～Day4までの5日間連続投与を行い、24日間の休薬期間を置いた (1サイクル)。次に、パクリタキセルをDay29から5日間連続投与した後、29日間の休薬期間を置き (2サイクル)、さらにパクリタキセルをDay63から5日間連続投与した (3サイクル)。

併用群：

FK330 100 mg/kg bid (200 mg/kg/day、実験開始から実験終了時まで連続投与) + パクリタキセル 10 mg/kg/day (各サイクル5日間連続投与)

FK330は1日2回、6から8時間間隔で強制経口投与 (5 mL/kg) した。パクリタキセルはFK330投与後1～4時間に尾静脈よりボラス投与 (10 mL/kg) した。

体重とデジタルノギスを用い腫瘍径を週2回測定した。腫瘍体積は (長径 x [短径]² x 0.5) の楕円体積の計算式より算出した。

[0084] 6) 統計解析

結果は平均値 (Mean) ±標準誤差 (SEM) で示した。試験期間中、触診限界以下を完全消失 (CR) として判定し、測定値は0とした。各測定時の腫瘍体積の実測値を用い、単独投与群と併用群の比較について、対応のない2群間の差の

検定 (Student's t-test) を行った。5%未満を有意差ありと判定した。データ処理にはGraphpad Prism version 5.03を用いた。

7) 結果

ヒト卵巣癌におけるFK330のパクリタキセルとの併用効果を検討した結果を図22に示した。ヒト卵巣癌 (MCAS) 担癌マウスにおいて、FK330はパクリタキセルの抗腫瘍効果を著明に増強し、Day63でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は61.5% (有意差なし)、Day91でのパクリタキセル単独群に対する腫瘍体積減少率は86.0% ($P < 0.05$) であった。

[0085] 結果は平均値 (Mean) $\pm$ 標準誤差 (SEM) で示した ($n=6$)。*: $P < 0.05$ は併用群をパクリタキセル単独投与群と比較した時の有意差を示す (Student's t-test)。

8) 結論

ヒト卵巣癌 (MCAS) 担癌マウスにおいて、FK330の併用は、複数サイクル投与によるパクリタキセルの抗腫瘍効果を増強し、腫瘍の再増殖を著明に抑制した。

産業上の利用可能性

[0086] 本発明のタキサン系抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与されるように用いられることを特徴とする、FK330又はその塩を有効成分として含有する癌治療用組成物は、タキサン系抗腫瘍剤との併用により高い癌治療効果が得られることから、殊に、既存のタキサン系抗腫瘍剤に適応されることが知られる各種癌の治療に有用である。適応される癌としては、タキサン系抗腫瘍剤が用いられている固形癌及びリンパ腫であり、ある態様としては、乳癌、子宮体癌、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、胃 (胃腺) 癌、非小細胞肺癌、膵臓癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、膀胱癌、メラノーマ、大腸癌、腎細胞癌、非ホジキンリンパ腫等が、別の態様としては、前立腺癌又は卵巣癌が挙げられる。

請求の範囲

- [請求項1] タキサン系抗腫瘍剤から選択される 1 以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与されるように用いられることを特徴とする、 N^2 -[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド又はその塩を有効成分として含有する前立腺癌又は卵巣癌治療用組成物。
- [請求項2] パクリタキセル又はドセタキセルと組み合わせて併用投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 1 記載の組成物。
- [請求項3] パクリタキセルと組み合わせて併用投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 2 記載の組成物。
- [請求項4] ドセタキセルと組み合わせて併用投与されるように用いられることを特徴とする、請求項 2 記載の組成物。
- [請求項5] 60～1200mg/日の N^2 -[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド又はその塩を包含する経口投与用組成物である請求項1乃至4記載の組成物。
- [請求項6] 60～200mg/日の N^2 -[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド又はその塩を包含する経口投与用組成物である請求項 5 記載の組成物。
- [請求項7] 更に、プラチナ系抗腫瘍剤、アントラサイクリン系抗腫瘍剤、シクロフォスファミド、フルオロウラシル、トラスツズマブ及びカペシタビンから選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与するよう
用いられることを特徴とする請求項1乃至6記載の組成物。
- [請求項8] タキサン系抗腫瘍剤から選択される 1 以上の抗腫瘍剤と同時に、別々

に、連続して、或いは、間隔をあけて投与されることを特徴とする、請求項1乃至6記載の組成物。

[請求項9] N^2 -[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド又はその塩を有効成分として含有する、タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤による治療を受けている対象を治療するための前立腺癌又は卵巣癌治療用組成物。

[請求項10] タキサン系抗腫瘍剤が用いられている前立腺癌の治療用である請求項1乃至9記載の組成物。

[請求項11] 前立腺癌が去勢抵抗性前立腺癌である請求項10記載の癌治療用組成物。

[請求項12] タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与されるように用いられることを特徴とする前立腺癌又は卵巣癌治療用組成物を製造するための、 N^2 -[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド又はその塩の使用。

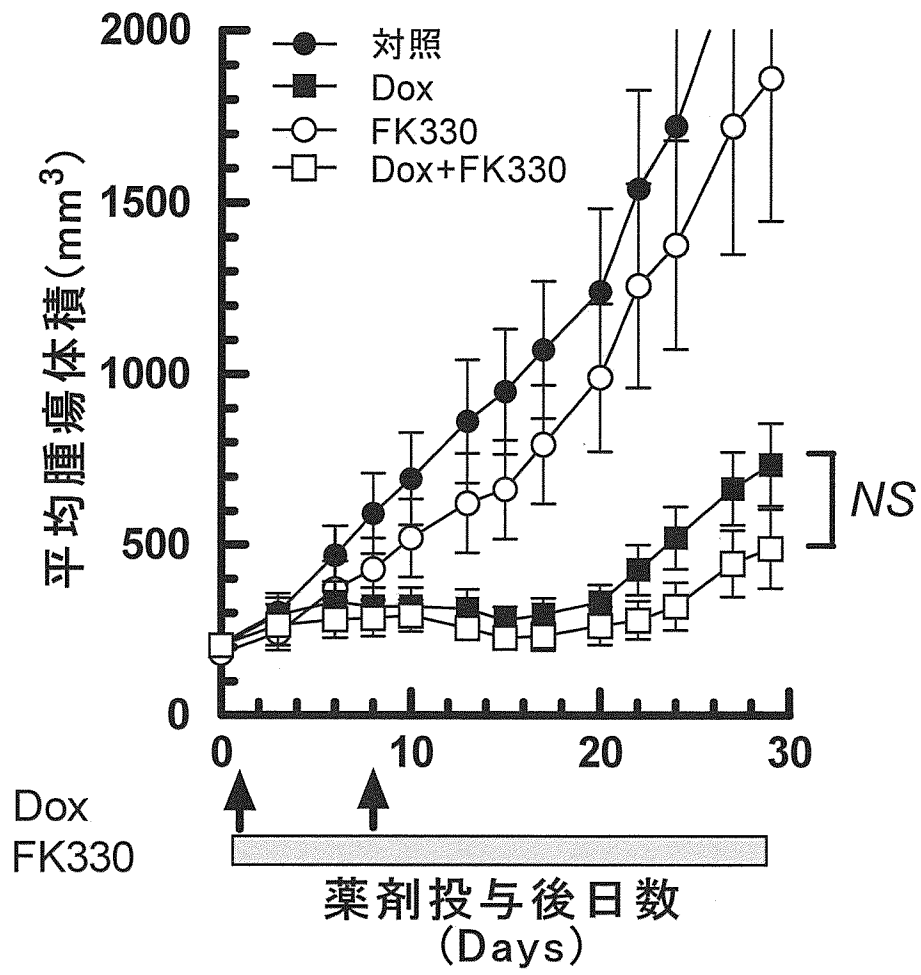
[請求項13] タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤と組み合わせて併用投与されるように用いられることを特徴とする、前立腺癌又は卵巣癌治療のための、 N^2 -[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド又はその塩。

[請求項14] タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の併用治療に用いる場合の治療有効用量、並びに、 N^2 -[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イ

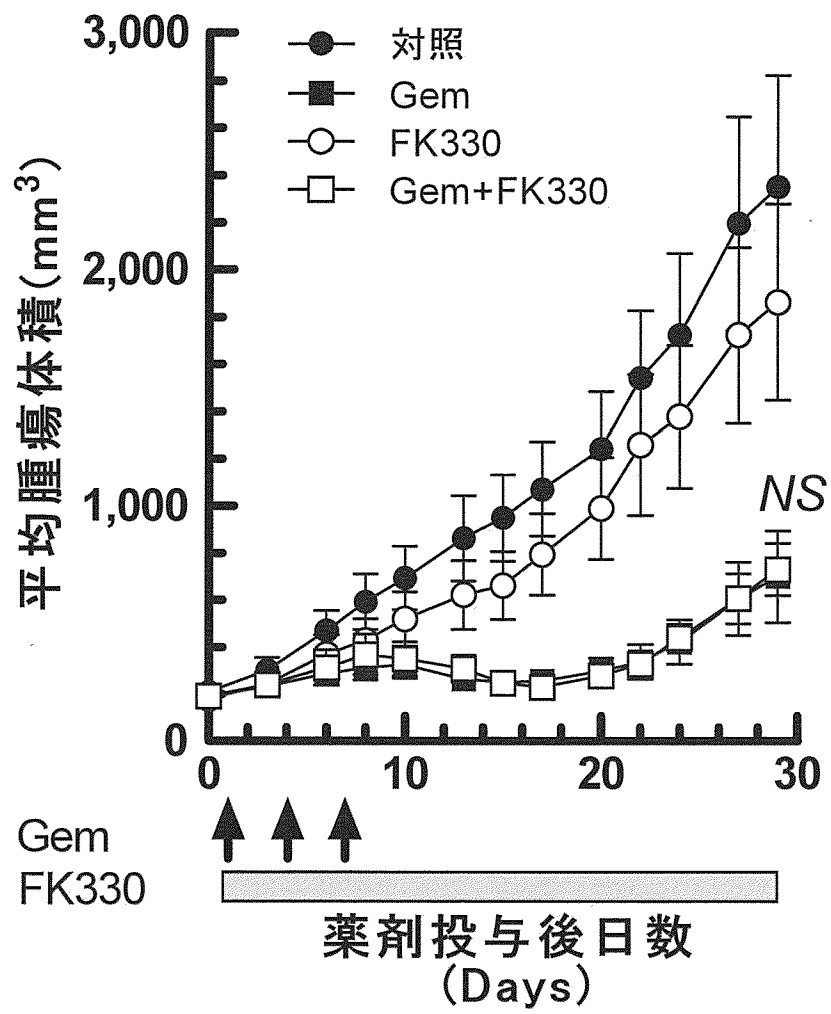
ル-L-アラニンアミド又はその塩の併用治療に用いる場合の治療有効用量を組み合わせ、対象に投与することを特徴とする前立腺癌又は卵巣癌の治療方法。

[請求項15] タキサン系抗腫瘍剤から選択される1以上の抗腫瘍剤の併用治療に用いる場合の治療有効用量、並びに、 N^2 -[(2E)-3-(4-クロロフェニル)-2-プロペノイル]-N-[2-オキソ-2-(4-{[6-(トリフルオロメチル)ピリミジン-4-イル]オキシ}ピペリジン-1-イル)エチル]-3-ピリジン-2-イル-L-アラニンアミド又はその塩の併用治療に用いる場合の治療有効用量を、同時に、別々に、連続して、或いは間隔をあけて、対象に投与することを特徴とする前立腺癌又は卵巣癌の治療方法。

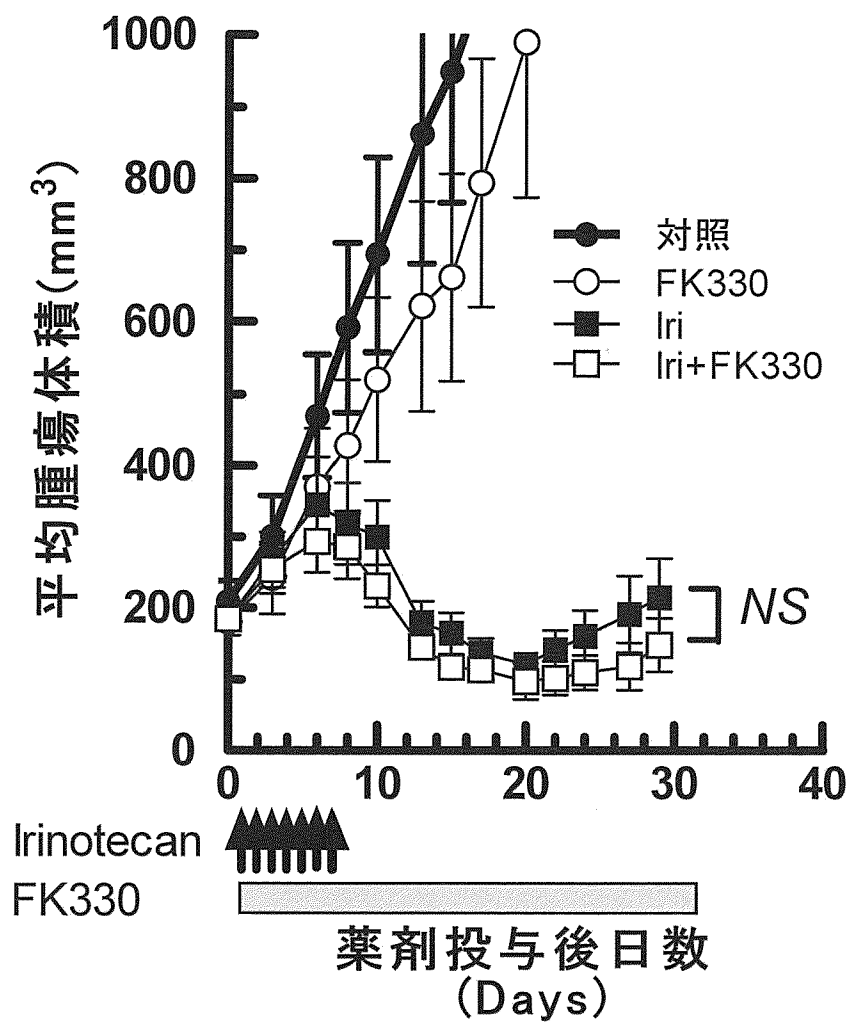
[図1]



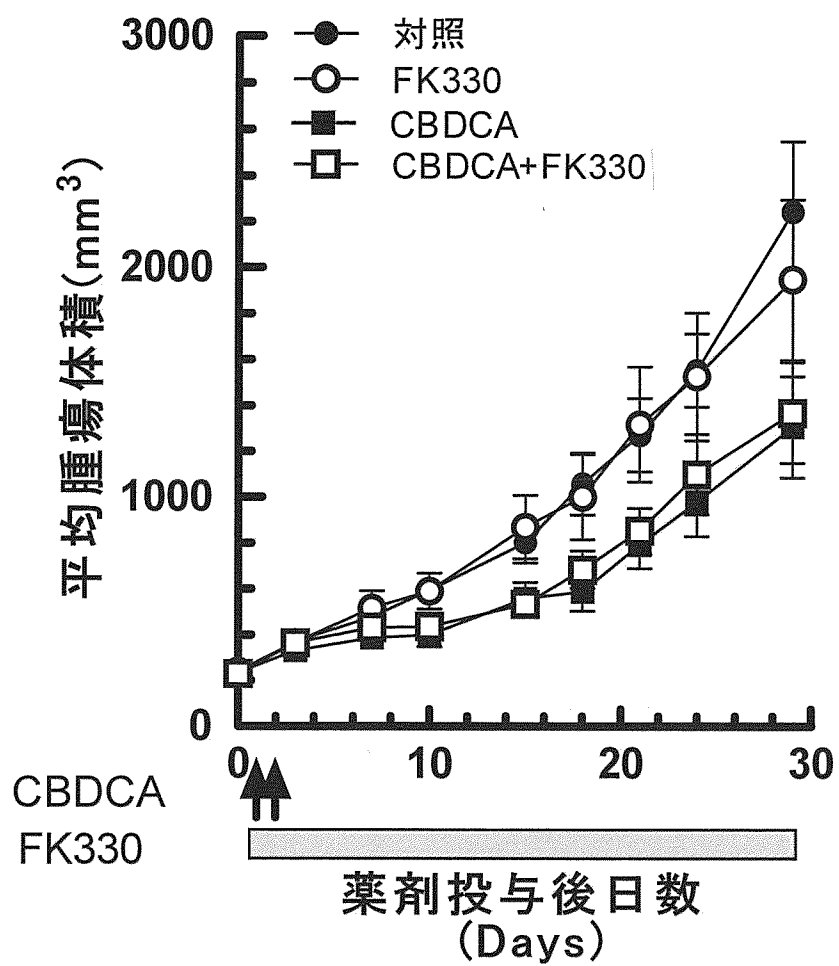
[図2]



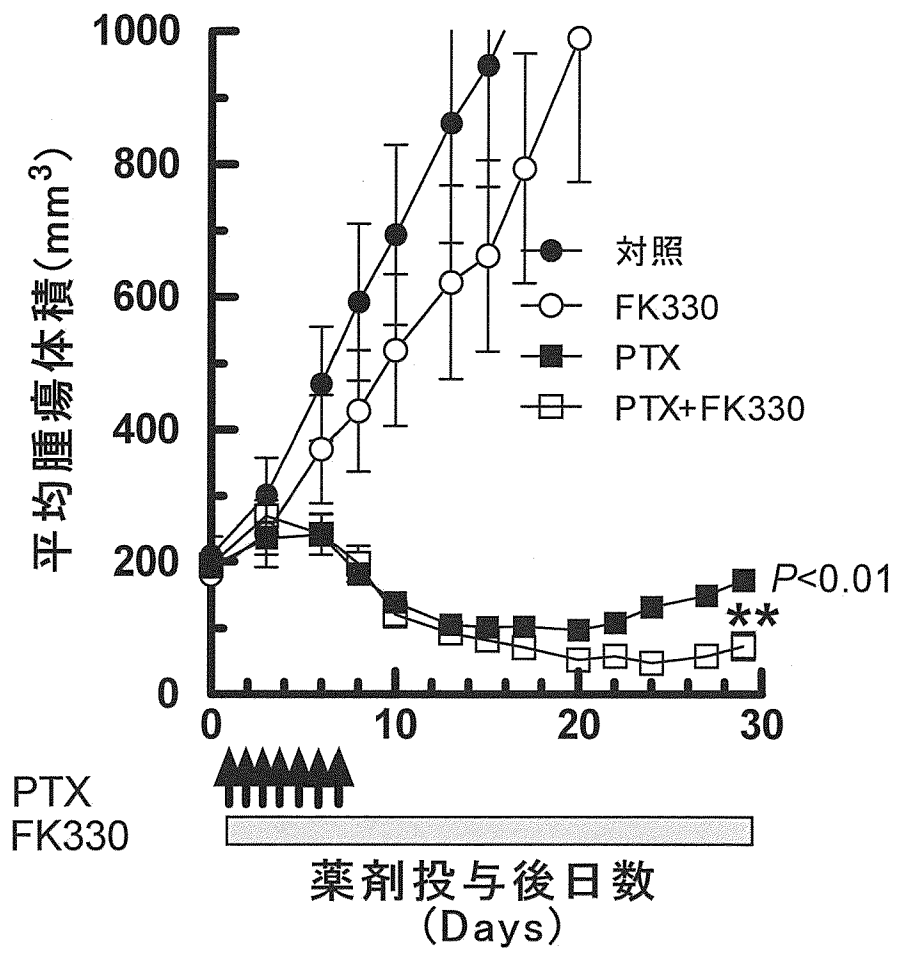
[図3]



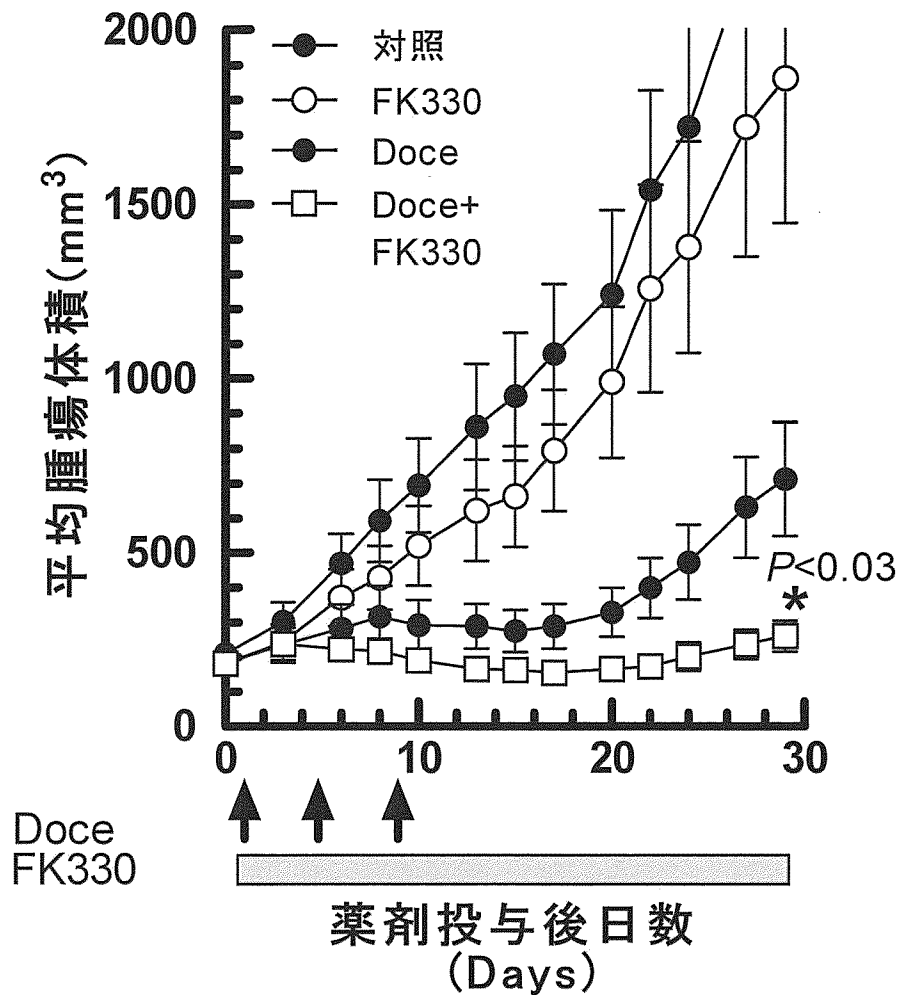
[図4]



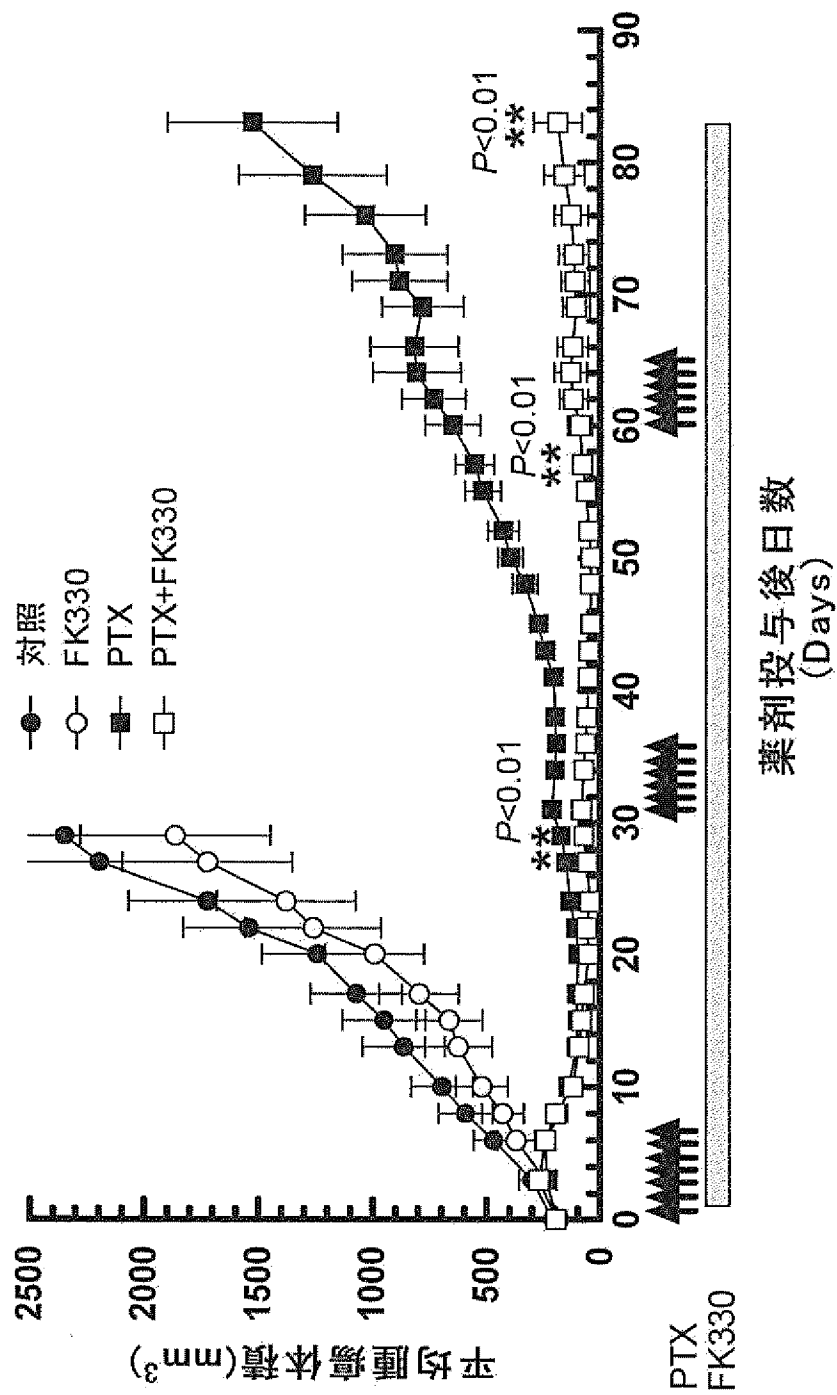
[図5]



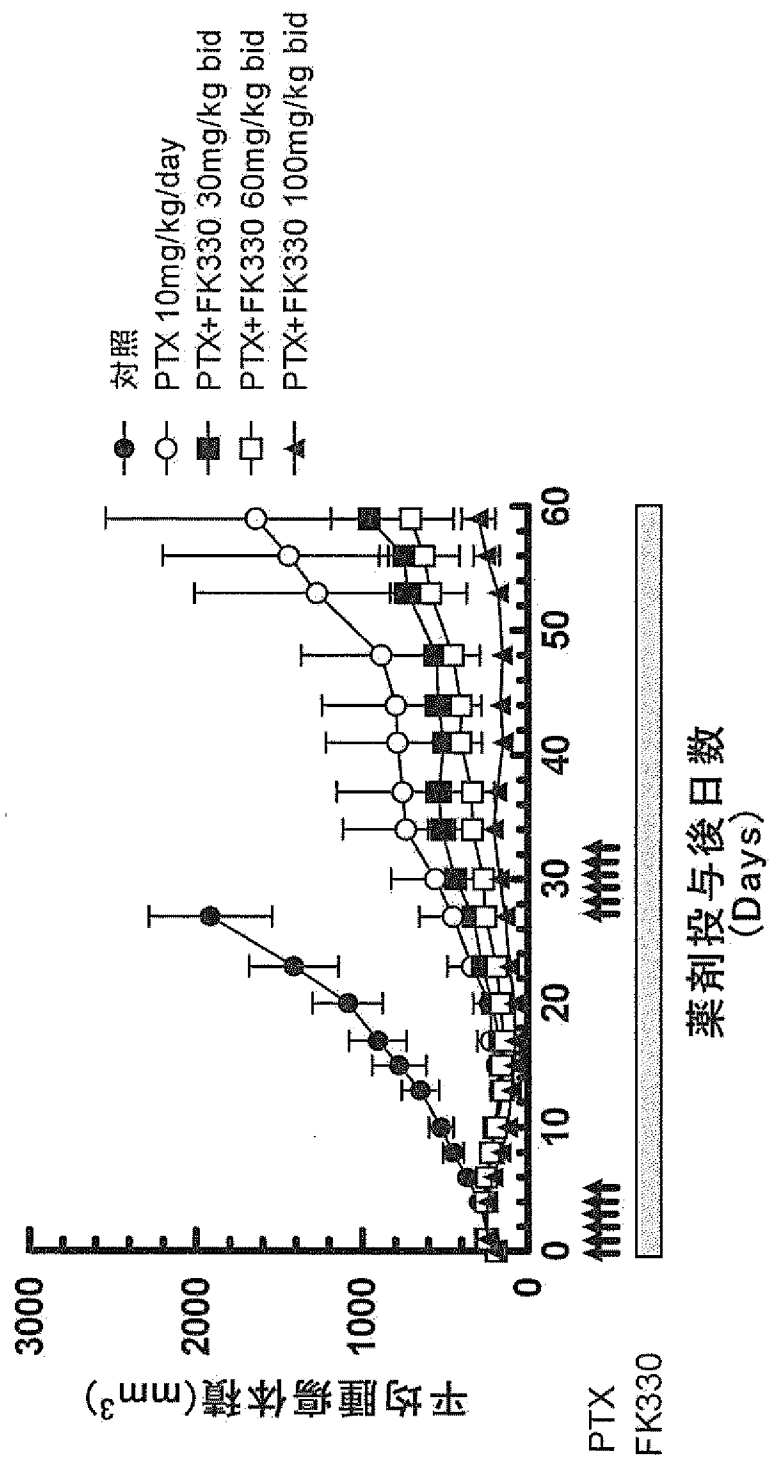
[図6]



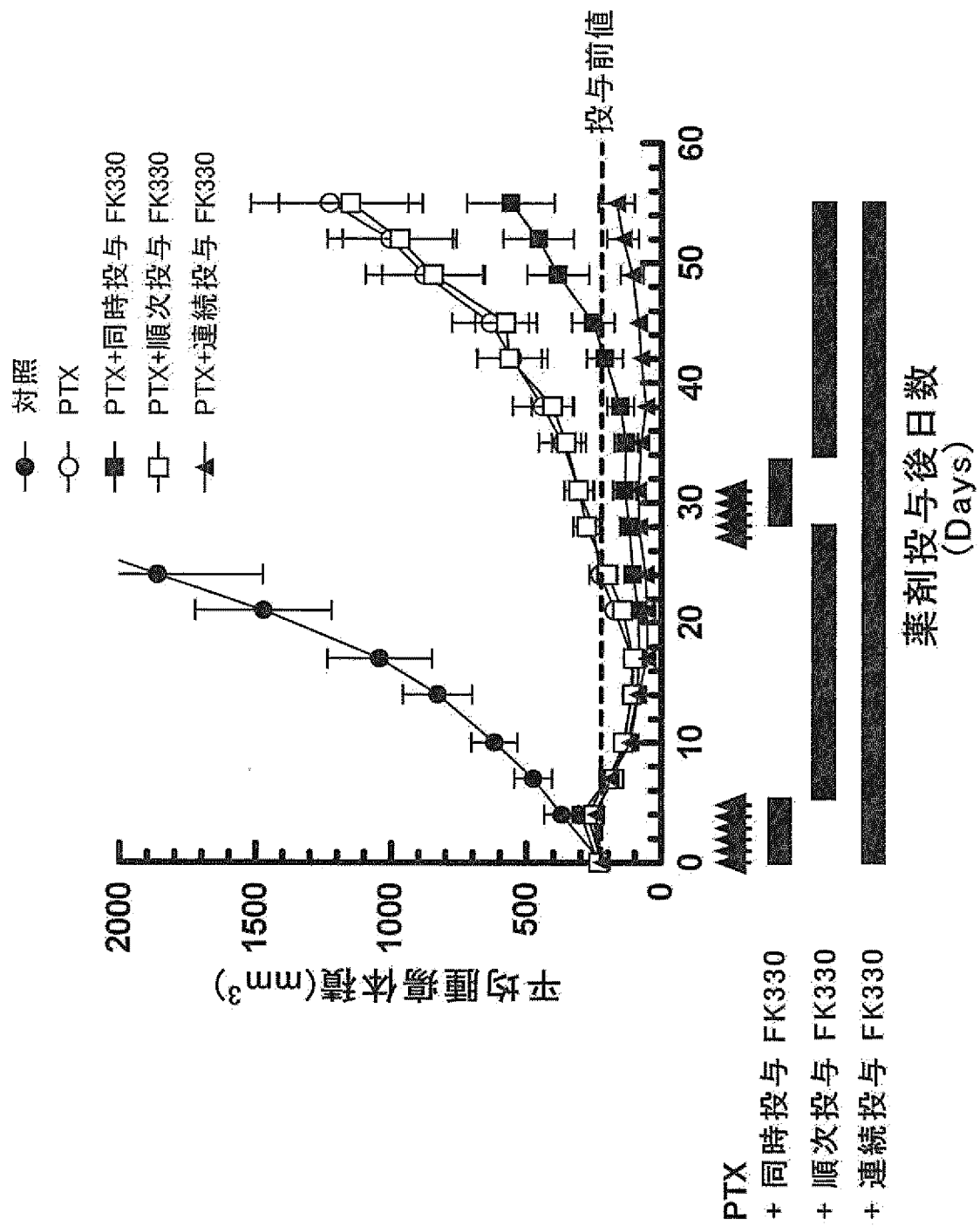
[図7]



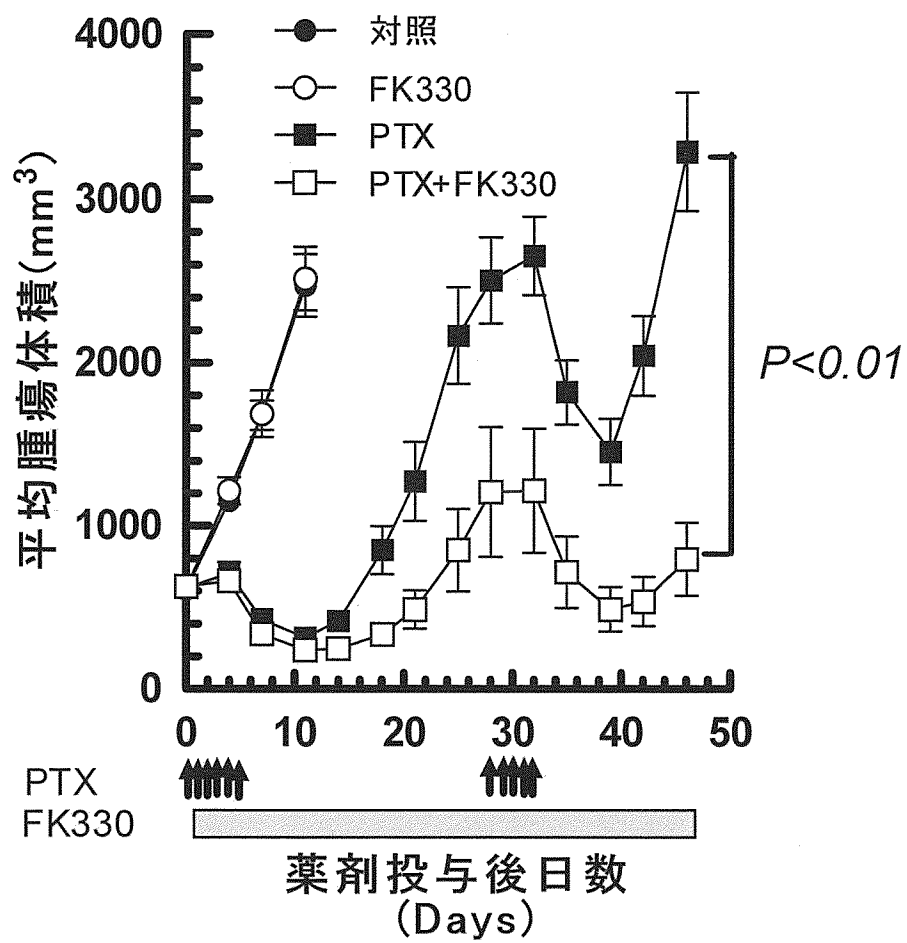
[図8]



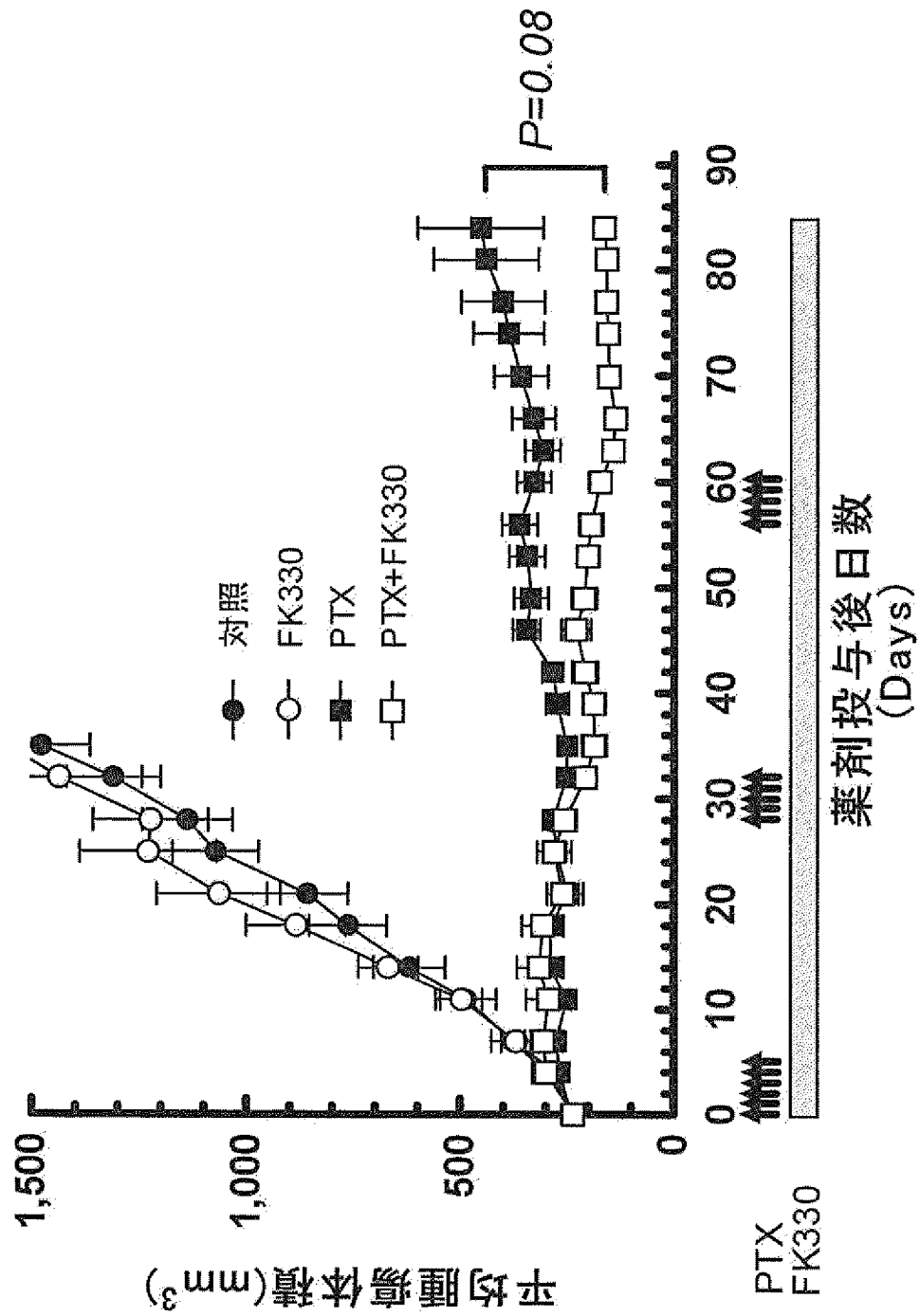
[図9]



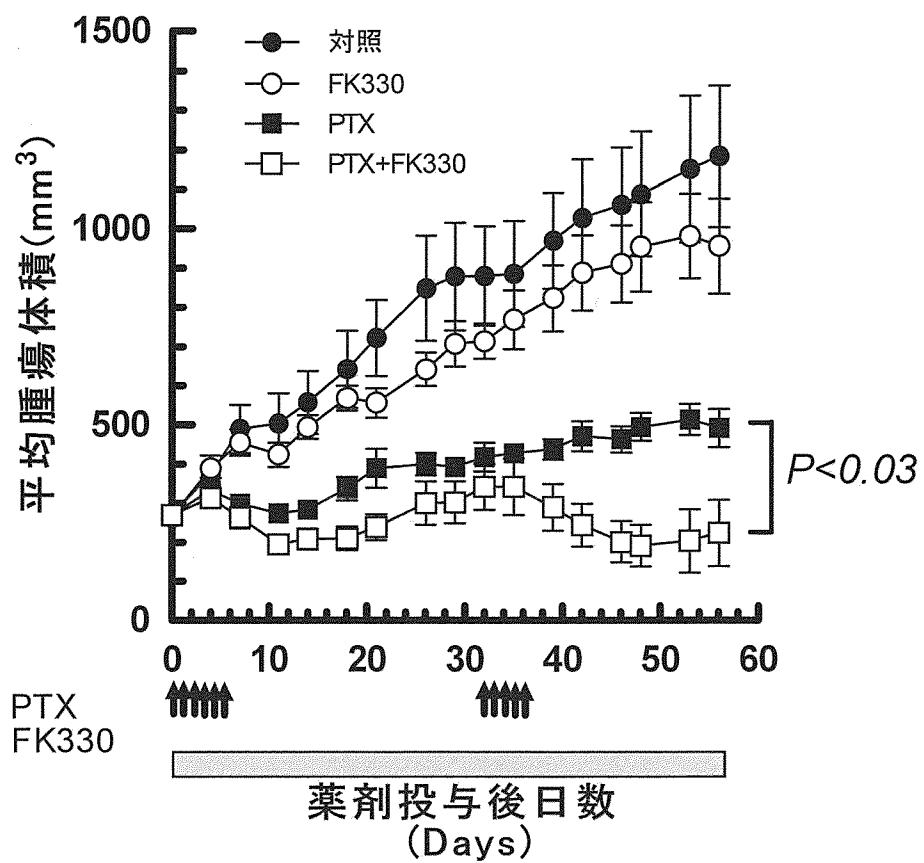
[図10]



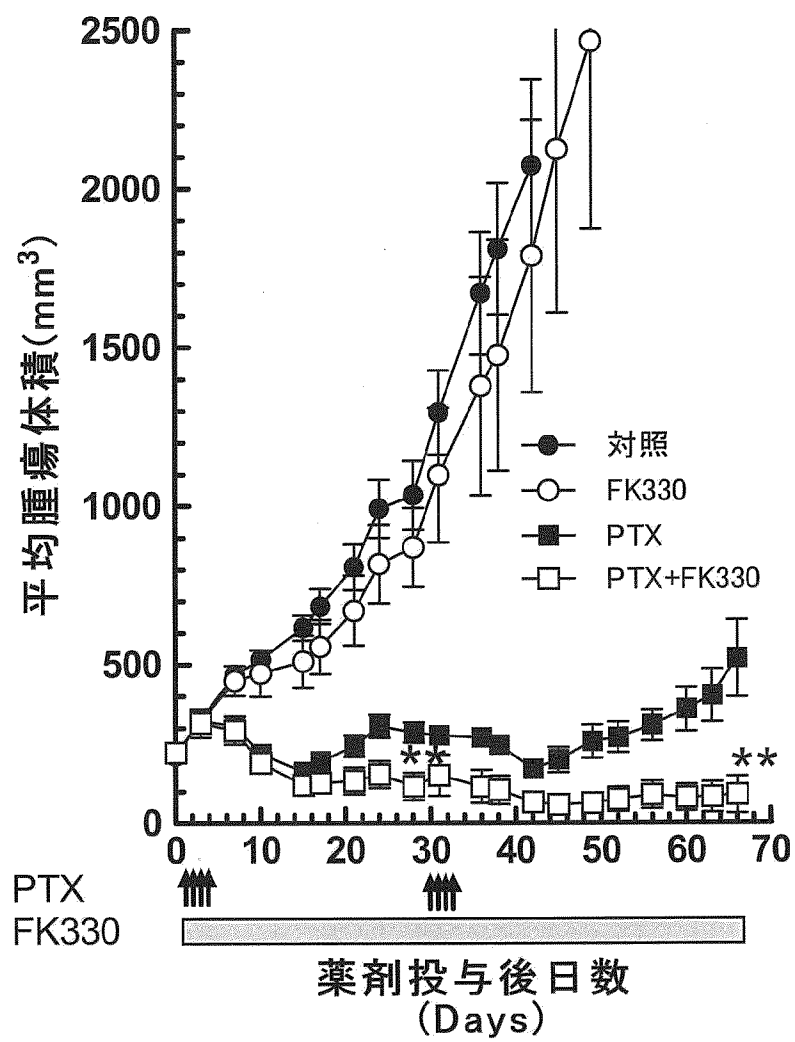
[図11]



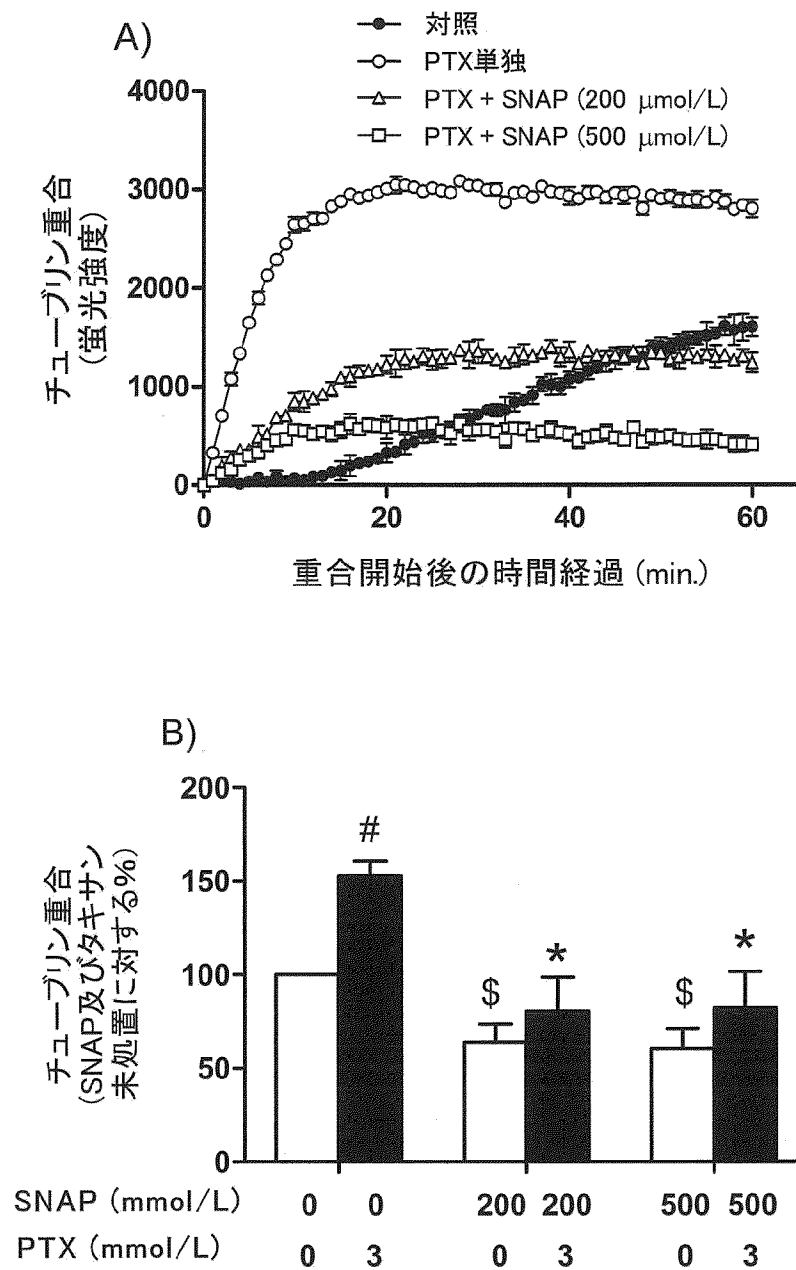
[図12]



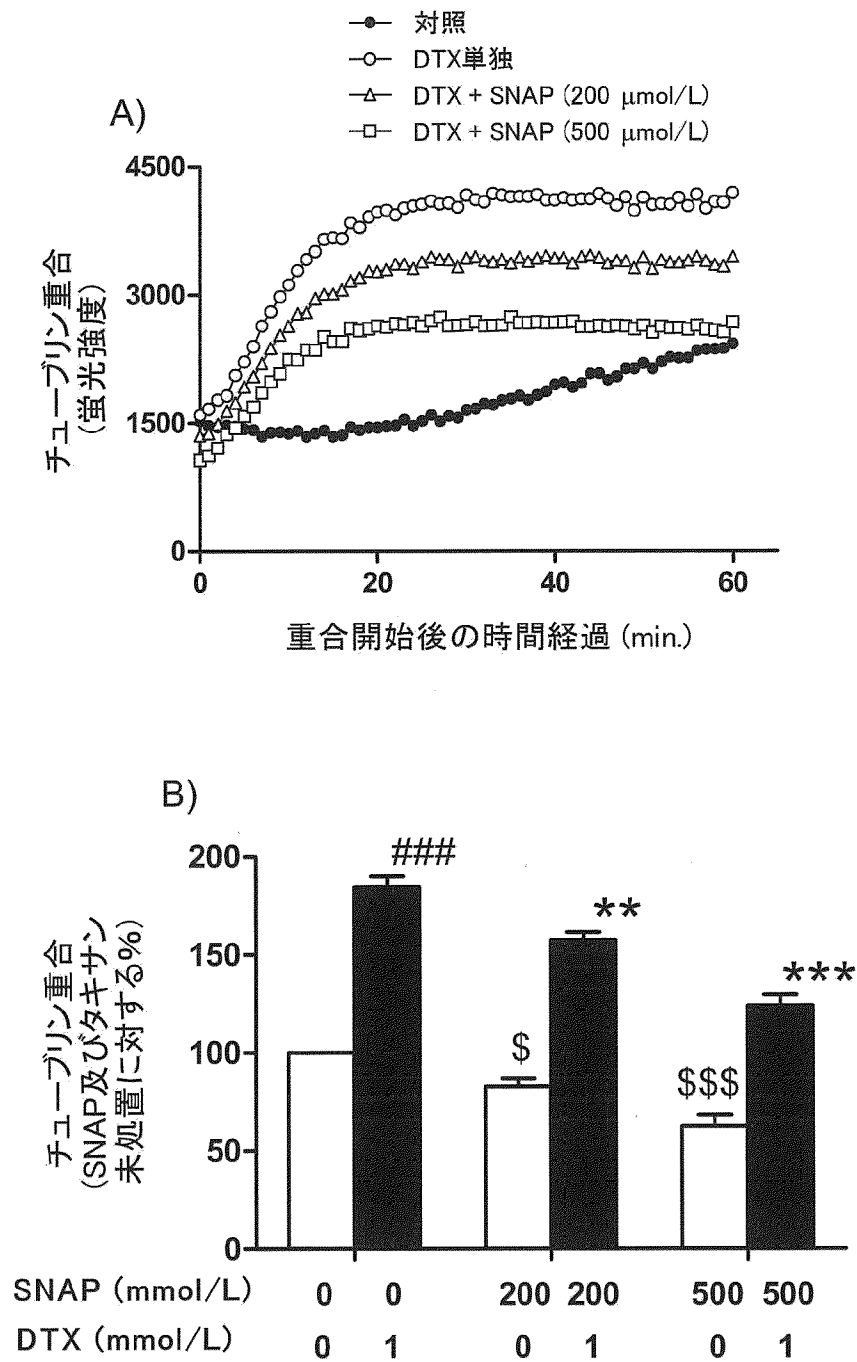
[図13]



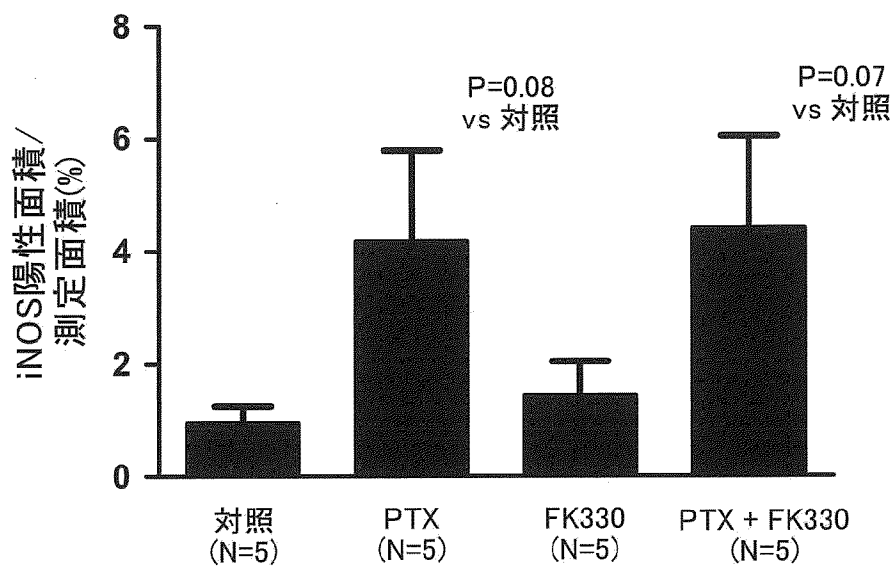
[図14]



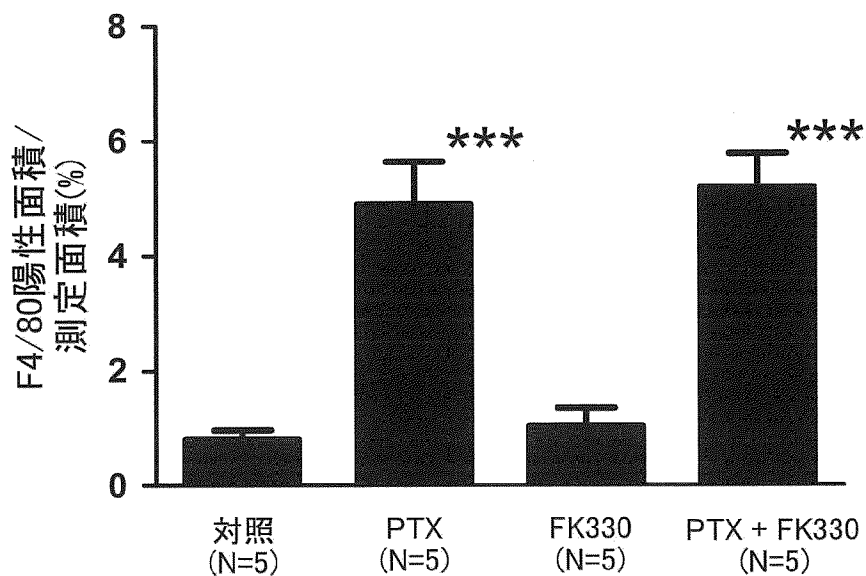
[図15]



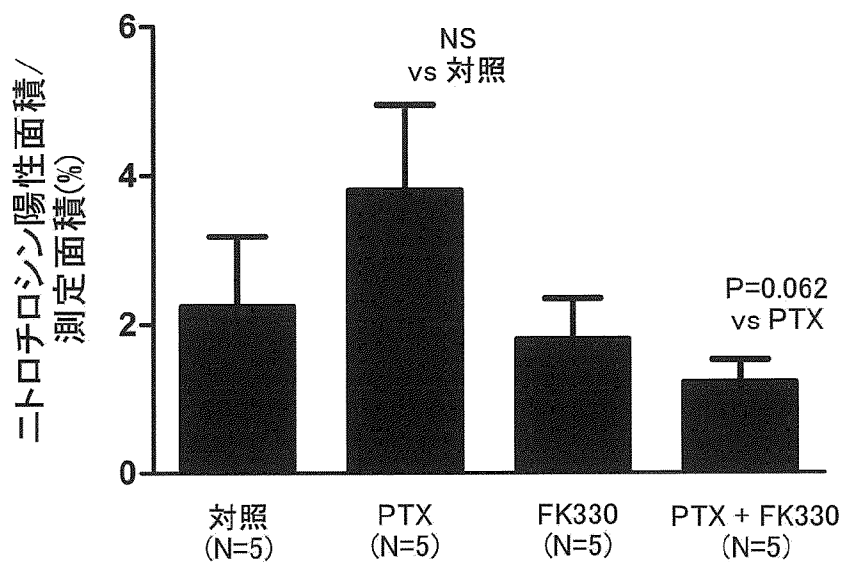
[図16]



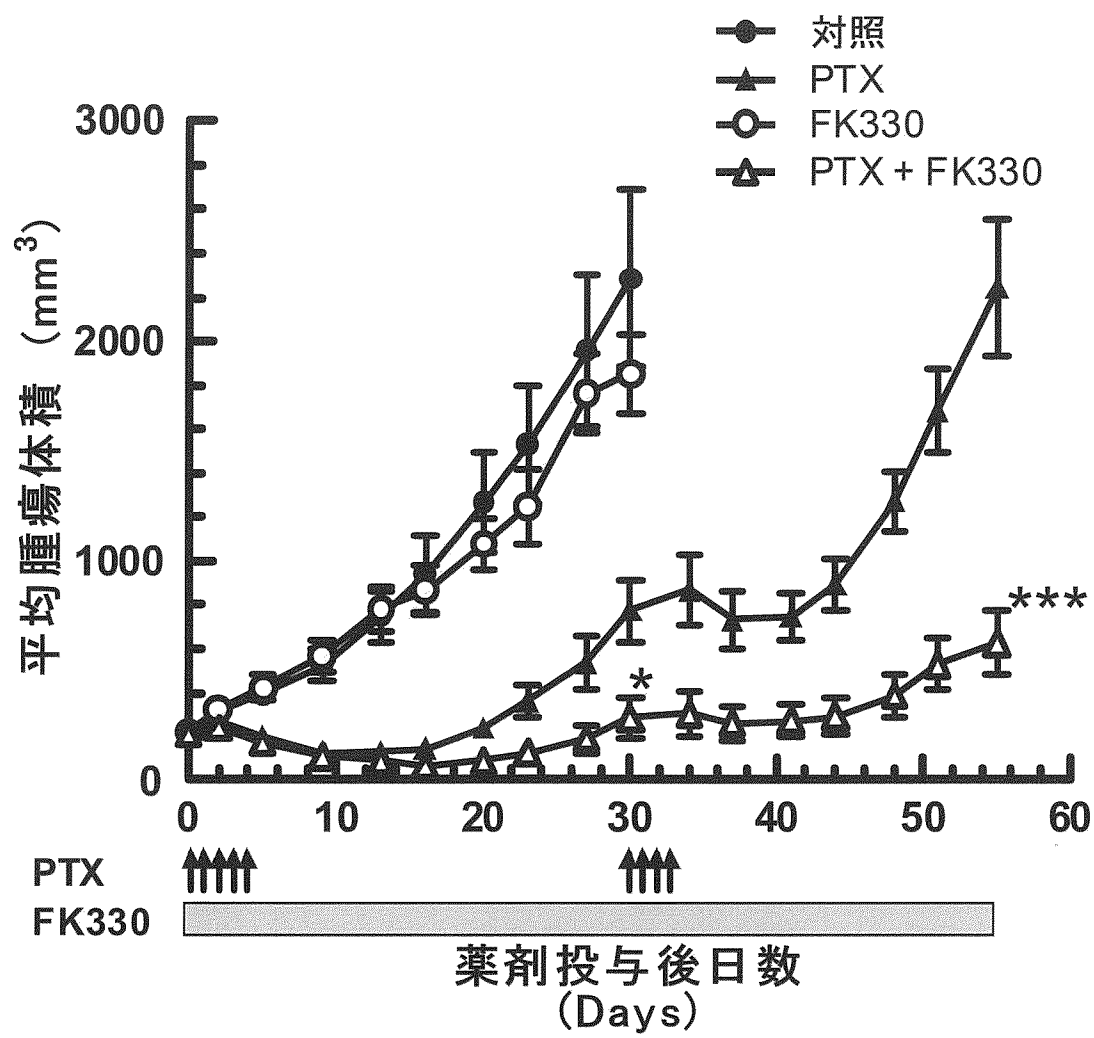
[図17]



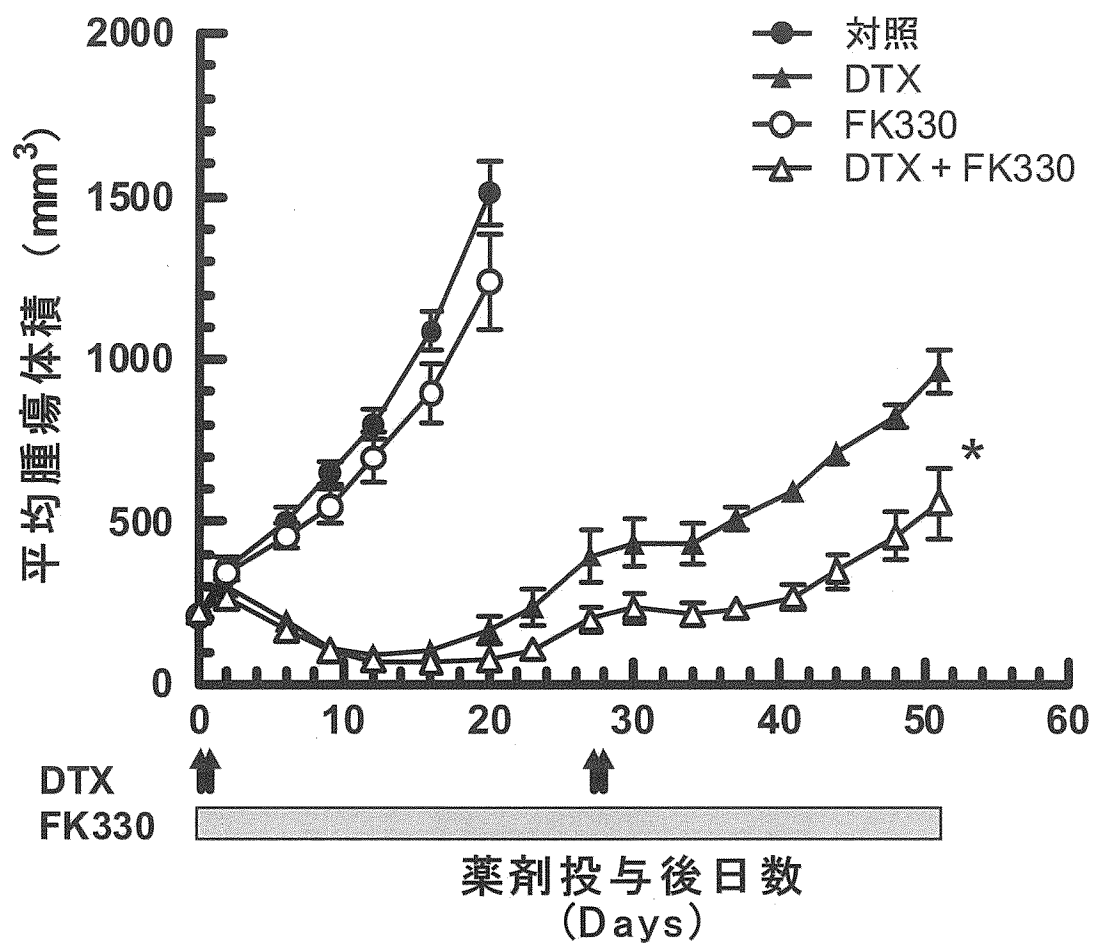
[図18]



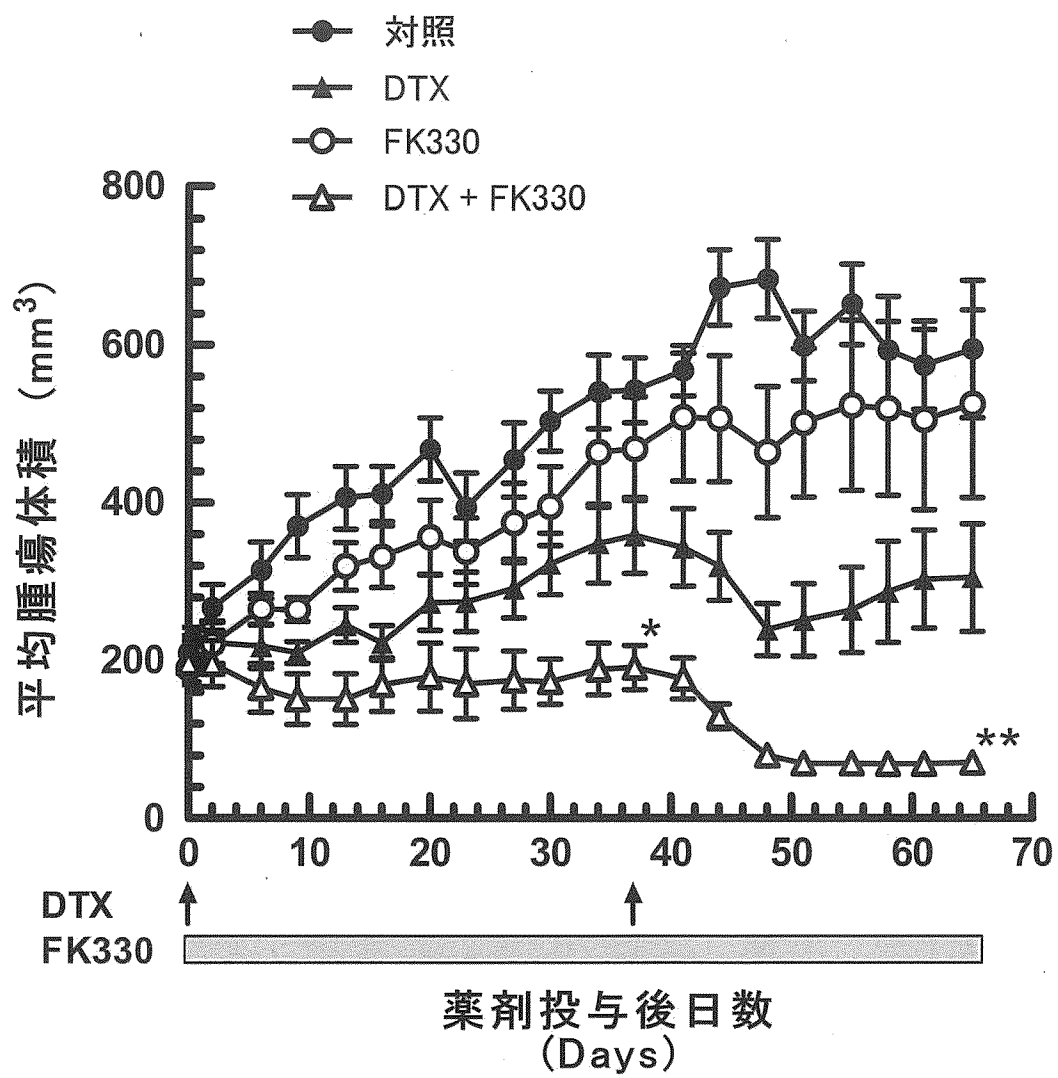
[図19]



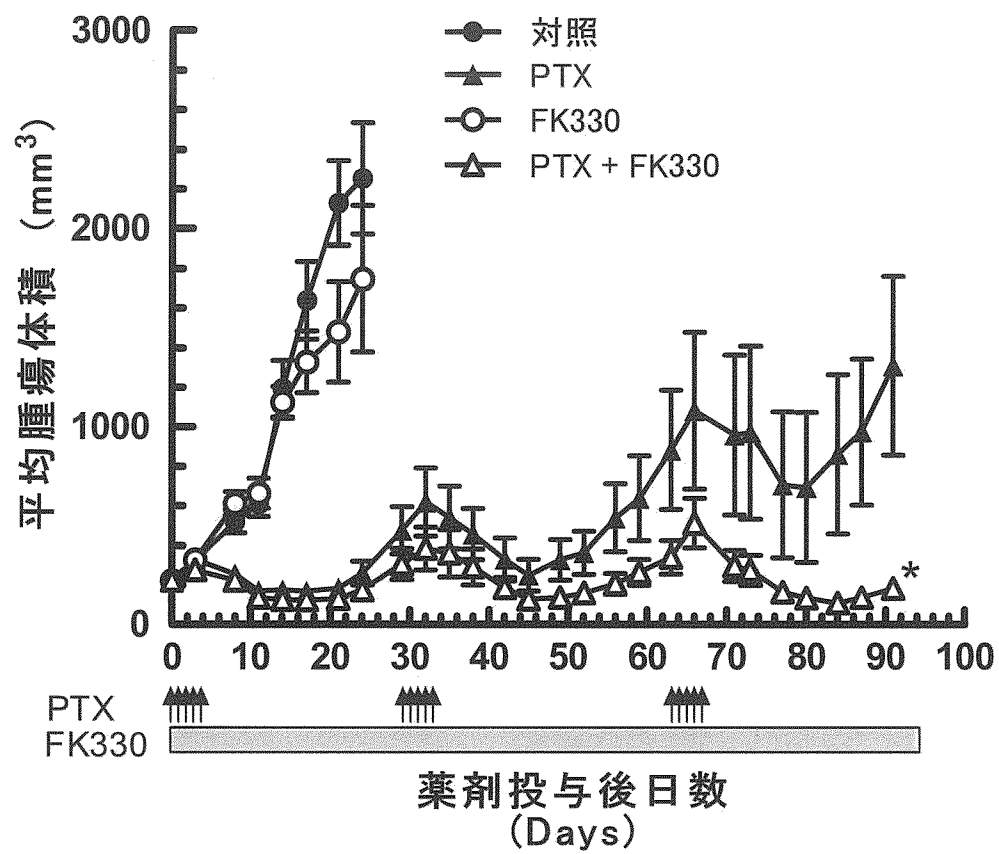
[図20]



[図21]



[図22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/052231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/506(2006.01)i, A61K31/337(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/506, A61K31/337, A61P35/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Chida N. et al, Pharmacological profile of FR260330, a novel orally active inducible nitric oxide synthase inhibitor, Eur J Pharmacol., 2005, 509(1), 71-76	13 1-12
A	Uneda S. et al, A nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-nitro-L-arginine-methyl-ester, exerts potent antiangiogenic, Br J Haematol., 2003, 120(3), 396-404	1-12
A	Toshiyuki SUWA et al., "NO Gosei Sogaizai: L-NAME no Gan Kekkan Shinsei ni Taisuru Sayo", Journal of Japan Surgical Society, 05 April 2005 (05.04.2005), vol.106, special extra issue, page 373	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 April, 2013 (22.04.13)

Date of mailing of the international search report
07 May, 2013 (07.05.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/052231

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Thomsen LL. et al, Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a inhibitor, Cancer Res., 1997.08.01, 57(15), 3300-3304	1-12
A	Cahlin C. et al, Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on tumor growth in mouse tumor models, Cancer Res., 2000.03.15, 60(6), 1742-1749	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/052231

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14, 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The claims 14 and 15 involve "methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy".
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/506 (2006.01)i, A61K31/337 (2006.01)i, A61P35/00 (2006.01)i, A61P43/00 (2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/506, A61K31/337, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	Chida N. et al, Pharmacological profile of FR260330, a novel orally active inducible nitric oxide synthase inhibitor, Eur J Pharmacol., 2005, 509(1), 71-76	13 1-12
A	Uneda S. et al, A nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-nitro-L-arginine-methyl-ester, exerts potent antiangiogenic, Br J Haematol., 2003, 120(3), 396-404	1-12

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 2 . 0 4 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 5 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

金子 亜希

4 C

3 9 5 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	諏訪敏之 他, NO 合成阻害剤 : L-NAME の癌血管新生に対する作用, 日本外科学会雑誌, 2005.04.05, 第 106 号 臨時増刊号, 第 373 頁	1-12
A	Thomsen LL. et al, Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase inhibits tumor growth in vivo: studies with 1400W, a inhibitor, Cancer Res., 1997.08.01, 57(15), 3300-3304	1-12
A	Cahlin C. et al, Effect of cyclooxygenase and nitric oxide synthase inhibitors on tumor growth in mouse tumor models, Cancer Res., 2000.03.15, 60(6), 1742-1749	1-12

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 1 4、1 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 1 4、1 5 は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」を包含するものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。